



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ & ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ

Διδακτορική Διατριβή

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ, ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΩΝ ΣΕ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ
***ACINETOBACTER BAUMANNII*»**

υπό

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑΣ Δ. ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΥ

Ιατρού Βιοπαθολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2017

© 2017 ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (14^η/20-07-2016 ΓΣΕΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου
Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας
Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Παναγιώτης Λιάκος
Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αθανάσιος Τσακρής
Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Παναγιώτης Μαρκουλάτος
Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Δημοσθένης Μακρής
Επίκουρος Καθηγητής Εντατικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Δημήτριος Μόσιαλος
Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διεξήχθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Χρήστου Χατζηχριστοδούλου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας, στο Βέλγιο. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Χατζηχριστοδούλου για την υποστήριξή του, την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου υπό την εποπτεία του και την πολύτιμη συμβολή του στη διεκπεραίωσή της.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον συν-επιβλέποντα Καθηγητή Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Σπυρίδων Πουρνάρα, για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε με την ανάθεση της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Το αμείωτο επιστημονικό του ενδιαφέρον και η πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωσή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Παναγιώτη Λιάκο, για τη βοήθειά του στη διεκπεραίωση της μελέτης.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου οφείλω να εκφράσω στον κ. Αθανάσιο Τσακρή, Καθηγητή Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολύτιμη υποστήριξή του κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να αναφερθώ και να ευχαριστήσω τον Professor Herman Goossens και την Dr. Surbhi Malhotra-Kumar για τη φιλοξενία τους στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας και για την ευκαιρία που μου παρείχαν στα πλαίσια της διατριβής αυτής να αποκτήσω εμπειρία σε συμβατικές μικροβιολογικές, μοριακές και γενετικές τεχνικές. Επιπλέον, ευχαριστώ τη FEMS (Federation of European Microbiological Societies) για την υποτροφία που μου χορήγησε προκειμένου να φιλοξενηθώ ως επισκέπτρια ερευνήτρια στο παραπάνω Εργαστήριο.

Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Δημοσθένη Μακρή και κ. Δημήτριο Μόσιαλο για την ευγενική αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον σύζυγό μου, τους γονείς μου και τα αδέρφια μου που είναι πάντα στο πλάι μου και με στηρίζουν σε κάθε μου προσπάθεια.

Λάρισα, 2017

Κωνσταντίνα Νταφοπούλου

Ιατρός Βιοπαθολόγος

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ, ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΩΝ ΣΕ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ
ACINETOBACTER BAUMANNII»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος**, Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας - **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας**, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
3. **Δρ. Παναγιώτης Λιάκος**, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
Εισαγωγή	12
1. Μικροβιολογία του γένους <i>Acinetobacter</i>	12
1.1. Ιστορική αναδρομή	12
1.2. Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.3. Ταξινόμηση του γένους <i>Acinetobacter</i>	14
1.4. Οικολογία των ειδών <i>Acinetobacter</i> με έμφαση στο <i>A. baumannii</i>	16
2. Μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους <i>Acinetobacter</i>	17
2.1. Εμπορικά συστήματα	17
2.2. Μοριακές τεχνικές	18
3. Η κλινική σημασία του <i>A. baumannii</i>	20
4. Μοριακές μέθοδοι για την επιδημιολογική τυποποίηση του <i>A. baumannii</i>	21
4.1. Μέθοδοι αποτυπωμάτων DNA (DNA fingerprinting methods)	22
4.2. Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR και την ανάλυση της αλληλουχίας	23
4.3. Ανάλυση αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος	26
5. Έλεγχος ευαισθησίας του <i>A. baumannii</i> στα αντιμικροβιακά	27
5.1. Όρια ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά	27
5.2. Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας και ερμηνεία του αντιβιογράμματος	28
6. Πληθυσμιακή δομή του <i>A. baumannii</i>	33
7. Λοιμογόννοι παράγοντες στο <i>A. baumannii</i>	34
8. Μικροβιακή αντοχή του <i>A. baumannii</i> στα αντιβιοτικά	36
8.1. Αντοχή στις καρβαπενέμες: Επιδημιολογία και μηχανισμοί	36
8.2. Αντοχή στην κολιστίνη: Επιδημιολογία και μηχανισμοί	43
8.3. Αντοχή στην τιγκεκυκλίνη: Επιδημιολογία και μηχανισμοί	47
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	50
II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
1. Βακτηριακά στελέχη	51
2. Ταυτοποίηση των στελεχών της συλλογής	52
2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	53
2.2. Εκχύλιση του βακτηριακού DNA	54

3. Μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη.....	54
3.1. Βακτηριακά στελέχη της μελέτης.....	55
3.2. Μοριακός έλεγχος για την ανίχνευση καρβαπενεμασών.....	55
3.3. Μέθοδοι <i>in vitro</i> προσδιορισμού της MIC στην κολιστίνη.....	56
3.4. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ανάλυση δεδομένων.....	58
4. Φαινοτυπική και μοριακή μελέτη και διερεύνηση της λοιμογόνου δύναμης κλινικών στελεχών <i>A. baumannii</i> ανθεκτικών στην κολιστίνη.....	59
4.1. Βακτηριακά στελέχη της μελέτης.....	59
4.2. Σταθερότητα του φαινοτύπου αντοχής στην κολιστίνη.....	60
4.3. Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης.....	60
4.4. Μοριακός έλεγχος καρβαπενεμασών και γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στην κολιστίνη.....	64
4.5. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>pmrCAB</i> με ποσοτική real-time RT-PCR.....	65
4.6. <i>In vitro</i> δοκιμασίες προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης.....	66
4.7. <i>In vitro</i> δοκιμασίες ανταγωνισμού.....	67
4.8. Έλεγχος σχηματισμού βιομεμβράνης - Στατικό και δυναμικό μοντέλο.....	68
4.9. Στατιστική ανάλυση.....	70
4.10. Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος των ColS/ColR στελεχών.....	70
5. Πολυκεντρική μοριακή επιδημιολογική μελέτη ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών <i>A. baumannii</i>.....	71
5.1. Βακτηριακά στελέχη της μελέτης.....	71
5.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά.....	71
5.3. Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών και αλληλουχιών εισδοχής.....	72
5.4. Μοριακή τυποποίηση.....	74
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
1. Μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη.....	76
1.1. Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών.....	76
1.2. Ευαισθησία στην κολιστίνη, EA, CA, ME και VME χρησιμοποιώντας την BMD ως μέθοδο αναφοράς.....	76
2. Φαινοτυπική και μοριακή μελέτη και διερεύνηση της λοιμογόνου δύναμης κλινικών στελεχών <i>A. baumannii</i> ανθεκτικών στην κολιστίνη.....	81
2.1. Πρώτο ζεύγος ColS/ColR στελεχών <i>A. baumannii</i>	81

2.2. Δεύτερο ζεύγος ColS/ColR στελεχών <i>A. baumannii</i>	82
2.3. Χαρακτηριστικά των στελεχών	82
2.4. Μέθοδοι τυποποίησης	84
2.5. PCR και αλληλούχιση	86
2.6. Ποσοτική real-time RT-PCR	89
2.7. <i>In vitro</i> δοκιμασίες προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης	90
2.8. <i>In vitro</i> δοκιμασίες ανταγωνισμού	92
2.9. Έλεγχος σχηματισμού βιομεμβράνης - Στατικό και δυναμικό μοντέλο	93
2.10. Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος των ColS/ColR στελεχών	96
3. Πολυκεντρική μοριακή επιδημιολογική μελέτη ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών <i>A. baumannii</i>	97
3.1. Δεδομένα ασθενών	97
3.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά	97
3.2.1. Συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη ...	97
3.3. Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών και αλληλουχιών εισδοχής	98
3.4. Μοριακή επιδημιολογία	99
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	113
ABSTRACT	116
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	119

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, το *Acinetobacter baumannii* έχει εξελιχθεί από συμβιωτικό, σχετικά χαμηλού βαθμού παθογόνο σε ένα από τα πιο σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα που προκαλούν λοιμώξεις, ιδιαίτερα στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) (1, 2). Ένας από τους κύριους λόγους που το *A. baumannii* βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια είναι η αξιοσημείωτη ικανότητά του να αποκτά και να συσσωρεύει πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής, που οδηγεί στην εμφάνιση πολυανθεκτικών (multidrug-resistant, MDR) στελεχών και το ξέσπασμα επιδημιών. Επίσης, μπορεί να επιβιώνει στο κλινικό περιβάλλον για παρατεταμένες περιόδους, γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την ικανότητά του να προκαλεί νοσοκομειακές επιδημίες (3, 4).

Από τις αρχές του 2000 άρχισε να εμφανίζεται μια προοδευτικά αυξανόμενη αντοχή στις καρβαπενέμες μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* σε όλο τον κόσμο. Σήμερα πλέον, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (carbapenem-resistant) *A. baumannii* (CRAB) θεωρούνται μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, λόγω των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών για την αντιμετώπισή τους (5). Στη χώρα μας, τα επίπεδα συνδυασμένης αντοχής των στελεχών *A. baumannii* σε φθοριοκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και καρβαπενέμες είναι τα υψηλότερα στην Ευρώπη και ξεπερνούν το 80% (6). Σε λοιμώξεις από τέτοια MDR στελέχη, κυρίως η κολιστίνη (επίσης γνωστή ως πολυμυξίνη Ε) ή η τιγκεκυκλίνη αποτελούν συχνά τα αντιβιοτικά τελευταίας εκλογής, έχουν όμως ήδη αναφερθεί στελέχη ανθεκτικά και σε αυτά, περιορίζοντας περαιτέρω τις θεραπευτικές επιλογές (7–9). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις περιορισμένες δυνατότητες για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών στο άμεσο μέλλον προκαλεί έντονη ανησυχία (2), ενώ παράλληλα τονίζει τη σημασία που έχει η διαφύλαξη της δραστηριότητας των ήδη υπαρχόντων αντιβιοτικών. Έτσι λοιπόν, η μελέτη της δραστηριότητας και των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά τελευταίας εκλογής και η διερεύνηση της μοριακής επιδημιολογίας των στελεχών *A. baumannii* είναι σημαντικές, προκειμένου να αναπτυχθούν στρατηγικές έγκαιρης παρέμβασης για τον έλεγχο της διασποράς τους και τον περιορισμό της ανάπτυξης αντοχής.

1. Μικροβιολογία του γένους *Acinetobacter*

1.1. Ιστορική αναδρομή

Το γένος *Acinetobacter* προτάθηκε για πρώτη φορά το 1954 από τους Brisou και Prévot. Η αρχική ανίχνευση του πρώτου στελέχους *Acinetobacter* χρονολογείται το 1911, όταν ο Ολλανδός μικροβιολόγος Beijerinck απομόνωσε τον μικροοργανισμό “*Micrococcus calcoaceticus*” που τελικά μετονομάστηκε ως *Acinetobacter calcoaceticus* (10, 11). Ο όρος *Acinetobacter* προήλθε από την ελληνική λέξη “akinetos”, η οποία σημαίνει “μη κινητό”. Ωστόσο, το δόγμα ότι τα *Acinetobacter* είναι μη κινητά έχει πλέον διαψευστεί. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα είδη *Acinetobacter*, και ιδίως το *A. baumannii*, κωδικογραφούν διάφορα γονίδια αναγκαία για την κινητικότητα και στην πραγματικότητα μπορεί να είναι κινητά όταν αναπτύσσονται σε ημιστερεά μέσα, σε απουσία φωτός (12, 13).

1.2. Γενικά χαρακτηριστικά

Το γένος *Acinetobacter* ανήκει στην οικογένεια των *Moraxellaceae*, στην τάξη των γ-πρωτεοβακτηρίων. Εξ’ ορισμού περιλαμβάνει Gram-αρνητικά, αυστηρά αερόβια, μη κινητά και μη ζυμωτικά κοκκοβακτηρίδια. Τα βακτήρια αυτά είναι καταλάση-θετικά, οξειδάση-αρνητικά και τα περισσότερα δεν ανάγουν τα νιτρικά. Στη χρώση Gram εμφανίζονται σαν μικρές, παχουλές, Gram-αρνητικές ράβδοι. Επειδή, όμως, δύσκολα αποχρωματίζονται μπορεί συχνά να αναγνωριστούν λανθασμένα σαν Gram-αρνητικοί ή Gram-θετικοί κόκκοι και για τον λόγο αυτόν είχαν ονομαστεί παλαιότερα “*Mimae*” (14, 15).

Η πλειονότητα των στελεχών *Acinetobacter* αναπτύσσονται μεταξύ 20°C και 37°C, ενώ η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 33-35°C. Τα είδη *Acinetobacter* από δείγματα ανθρώπινης προέλευσης αναπτύσσονται εύκολα στα συνήθη στερεά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα των κλινικών μικροβιολογικών εργαστηρίων (όπως το αιματούχο άγαρ ή το tryptic soy άγαρ), σε θερμοκρασία επώασης 37°C. Σχηματίζουν λείες, θολωτές, συχνά βλεννώδεις, γκριζόλευκες αποικίες. Οι αποικίες των στελεχών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex εμφανίζουν διάμετρο 1.5-3 mm μετά από 18ωρη επώαση και ομοιάζουν με αυτές των Εντεροβακτηριακών, ενώ τα περισσότερα από τα άλλα είδη *Acinetobacter* σχηματίζουν μικρότερες και πιο διαφανείς αποικίες. Πολλά είδη, μεταξύ των οποίων τα στελέχη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex, αναπτύσσονται στο McConkey άγαρ. Στο αιματούχο άγαρ, τα στελέχη του είδους *A. haemolyticus* και μερικών άλλων ειδών μπορεί να εμφανίζουν αιμόλυση, ενώ η ιδιότητα αυτή είναι αρνητική στα στελέχη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (14, 15).

1.3. Ταξινόμηση του γένους *Acinetobacter*

Επί του παρόντος, το γένος *Acinetobacter* αποτελείται από 53 διαφορετικά είδη με έγκυρα δημοσιευμένα ονόματα (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>), τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 1. Μόλις ένα προτεινόμενο νέο όνομα του είδους δημοσιεύεται στην επικυρωμένη λίστα του περιοδικού International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [IJSEM, (<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem>)] γίνεται δεκτό ως έγκυρο όνομα του είδους. Το γένος *Acinetobacter* επίσης περιλαμβάνει 7 είδη με προσωρινή ονομασία, κυρίως γενωμικά είδη (genomic species) που διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων, και 9 είδη με δημοσιευμένα μη έγκυρα ονόματα, δηλαδή ονόματα ειδών που δεν έχουν ακόμη επικυρωθεί από το IJSEM.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, το *A. grimontii* είναι ταξινομικά ταυτόσημο με το *A. junii* και το *A. pakistanensis* ταυτόσημο με το *A. bohemicus*. Αρκετά γενωμικά είδη φέρουν συγκεκριμένες συντομογραφίες που αντιστοιχούν στα αρχικά των συγγραφέων που τα περιέγραψαν για πρώτη φορά. Για παράδειγμα, η συντομογραφία BJ αναφέρεται στους Bouvet και Jeanjean, ενώ η TU στους Tjernberg και Ursing. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, αρκετά είδη με προσωρινές ονομασίες έχουν λάβει έγκυρα ονόματα. Για παράδειγμα, οι Tjernberg & Ursing έδειξαν ότι το *Acinetobacter* genomic species 12 αντιστοιχεί στο *A. radioresistens* (17). Επιπλέον, ο Nemec *et al.* πρόσφατα πρότειναν ονόματα για τα *Acinetobacter* genomic species 3, 10, 11 και 13TU, που πλέον έχουν επικυρωθεί ως *A. pittii*, *A. bereziniae*, *A. guillouiae* και *A. nosocomialis*, αντίστοιχα (18, 19).

Πίνακας 1. Τα είδη του γένους *Acinetobacter* με έγκυρα δημοσιευμένα ονόματα

(προσαρμοσμένο από <http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>)

Έγκυρα δημοσιευμένα ονόματα (n =53)	Πρώην (ανεπίσημη) ονομασία	Απομόνωση (κυρίως) από	Αναφορά
<i>A. albensis</i>	Taxon 31	Έδαφος, νερό	(20)
<i>A. apis</i>		Έντερο μέλισσών	(21)
<i>A. baumannii</i>	Genomic species 2	Άνθρωπος, θερμόαιμα ζώα	(22)
<i>A. baylyi</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς, έδαφος	(23)
<i>A. beijerinckii</i>	Phenon 7	Άνθρωπος, ζώα, έδαφος, νερό	(24)
<i>A. bereziniae</i>	Genomic species 10	Άνθρωπος	(18, 22)
<i>A. bohemicus</i>	Taxon 26	Έδαφος, νερό	(25)
<i>A. boissieri</i>		Νέκταρ λουλουδιών	(26)
<i>A. bouvetii</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς	(23)
<i>A. brisouii</i>		Τύρφη	(27)

<i>A. calcoaceticus</i>	Genomic species 1	Έδαφος, νερό, άνθρωπος	(22)
<i>A. celticus</i>	Taxon 33	Έδαφος, νερό	(28)
<i>A. courvalinii</i>	Genomic species 14BJ	Άνθρωπος, ζώα	(29, 30)
<i>A. dijkshoorniae</i>	NB14	Άνθρωπος, νερό	(31)
<i>A. dispersus</i>	Genomic species 17	Έδαφος, νερό, άνθρωπος	(29, 30)
<i>A. equi</i>		Άλογο	(32)
<i>A. gandensis</i>	Taxon 30	Άλογο, βοοειδή, νερό	(33)
<i>A. gernerii</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς	(23)
<i>A. grimontii</i> (= <i>A. junii</i>)		Ενεργοποιημένη ιλύς	(16, 23)
<i>A. guangdongensis</i>		Μετάλλευμα Pb ⁺⁺ /Zn ⁺⁺	(34)
<i>A. guillouiae</i>	Genomic species 11	Έδαφος, νερό, άνθρωπος	(18, 22)
<i>A. gyllenbergii</i>	Phenon 3	Άνθρωπος	(24)
<i>A. haemolyticus</i>	Genomic species 4	Άνθρωπος	(22)
<i>A. harbinensis</i>		Νερό ποταμού	(35)
<i>A. indicus</i>		Έδαφος	(36)
<i>A. johnsonii</i>	Genomic species 7	Έδαφος, νερό, άνθρωπος, ζώα	(22)
<i>A. junii</i>	Genomic species 5	Άνθρωπος, ζώα, νερό, έδαφος	(22)
<i>A. kookii</i>		Έδαφος, νερό	(37)
<i>A. lactucae</i>		Μαρούλι	(38)
<i>A. lwoffii</i>	Genomic species 9	Άνθρωπος, ζώα, έδαφος, νερό	(17, 22)
<i>A. modestus</i>	Taxon 18	Άνθρωπος, νερό	(29, 39)
<i>A. nectaris</i>		Νέκταρ λουλουδιών	(26)
<i>A. nosocomialis</i>	Genomic species 13TU	Άνθρωπος	(17, 19)
<i>A. pakistanensis</i> (= <i>A. bohemicus</i>)		Λύματα	(40, 41)
<i>A. parvus</i>	Phenon 4	Άνθρωπος, ζώα	(42)
<i>A. pittii</i>	Genomic species 3	Άνθρωπος, έδαφος, νερό	(19, 22)
<i>A. populi</i>		Φλοιός λεύκας	(43)
<i>A. pragensis</i>	Taxon 28	Έδαφος, νερό	(44)
<i>A. proteolyticus</i>	Taxon 19	Άνθρωπος	(29, 39)
<i>A. puyangensis</i>		Φλοιός λεύκας	(45)
<i>A. qingfengensis</i>		Φλοιός λεύκας	(46)
<i>A. radioresistens</i>	Genomic species 12	Άνθρωπος, έδαφος, βαμπάκι	(22, 47)
<i>A. rudis</i>		Νωπό γάλα, λύματα	(48)
<i>A. schindleri</i>	Phenon 2	Άνθρωπος, ζώα	(49)
<i>A. seifertii</i>	'Close to 13TU'	Άνθρωπος	(50, 51)
<i>A. soli</i>		Έδαφος, άνθρωπος	(52)
<i>A. tandoii</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς, νερό, έδαφος	(23)
<i>A. tjernbergiae</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς	(23)
<i>A. towneri</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς, νερό, έδαφος	(23)
<i>A. ursingii</i>	Phenon 1	Άνθρωπος	(49)
<i>A. variabilis</i>	Genomic species 15TU	Άνθρωπος, ζώα, έδαφος	(53)
<i>A. venetianus</i>		Θαλασσινό νερό	(54, 55)
<i>A. vivianii</i>	Taxon 20	Άνθρωπος, έδαφος, νερό	(29, 39)

Τα τρία κλινικά είδη *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* και το περιβαλλοντικό είδος *A. calcoaceticus* εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια σύμφωνα με μελέτες υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων, ενώ δύσκολα μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους με φαινοτυπικά κριτήρια. Για λόγους ευκολίας, πολλά εργαστήρια αναφέρονται σε αυτά σαν μία ομάδα που ονομάζεται *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Acb) complex (15).

1.4. Οικολογία των ειδών *Acinetobacter* με έμφαση στο *A. baumannii*

Οι γνώσεις μας σχετικά με την οικολογία των περισσότερων ειδών *Acinetobacter* είναι περιορισμένες. Παρόλο που πολλά από τα είδη που αναφέρονται στον Πίνακα 1 έχουν βρεθεί σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα, λίγα μόνο θεωρούνται ότι έχουν κλινική σημασία. Ακόμη όμως και τα κλινικά σημαντικά είδη θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα, τα οποία συνήθως προσβάλλουν μόνο νοσηλευόμενους ασθενείς σε σοβαρή κατάσταση. Μέχρι σήμερα, το πιο διαδεδομένο κλινικά σημαντικό είδος του γένους *Acinetobacter* είναι το *A. baumannii*, το οποίο παρουσιάζει υψηλή τάση για πολυαντοχή στα αντιβιοτικά και συνδέεται πολύ συχνά με εκτεταμένες επιδημίες. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αυξάνονται οι αναφορές που δηλώνουν ότι τα στενά συγγενικά είδη *A. pittii* και *A. nosocomialis* μπορούν να διαδραματίσουν παρόμοιο ρόλο με το *A. baumannii* στα νοσοκομεία και να προκαλέσουν επιδημίες (12). Η σχετική κατανομή των τριών παραπάνω ειδών τόσο στα νοσοκομεία, όσο και στην κοινότητα και σε περιβαλλοντικά δείγματα φαίνεται ότι ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή (56–58).

Άλλα είδη που έχουν συσχετιστεί περιστασιακά με νοσοκομειακές λοιμώξεις είναι τα *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. haemolyticus*, *A. parvus*, *A. ursingii* και *A. schindleri*. Γενικά, οι λοιμώξεις που προκαλούν τα είδη αυτά είναι λιγότερο συχνές σε σχέση με τις λοιμώξεις που προκαλεί το *A. baumannii* και συχνά είναι ιατρογενούς προέλευσης. Επίσης, μερικά από τα είδη αυτά μπορεί να εμφανιστούν στο δέρμα σαν αποικιστές (56). Πρόσφατα περιγράφηκε ένα αναδυόμενο παθογόνο στην Ασία, το *A. seifertii*. Το είδος αυτό είναι γενετικά στενά συνδεδεμένο και μπορεί να αναγνωριστεί λανθασμένα ως *A. baumannii* (50, 59, 60).

Το *A. baumannii* έχει βρεθεί σπάνια και στο δέρμα υγιών ανθρώπων (61). Αντίθετα, το *A. pittii* φαίνεται να εμφανίζει σχετικά υψηλά ποσοστά φορείας στο δέρμα (62), ενώ το είδος αυτό έχει βρεθεί στα λαχανικά και το έδαφος. Αν και τα είδη *A. baumannii* και *A. nosocomialis* έχουν απομονωθεί από τα λαχανικά, το ανθρώπινο δέρμα, τις ψείρες του

σώματος ή τα ζώα, κυρίως απομονώνονται από κλινικά δείγματα (14, 63). Στο νοσοκομείο, το *A. baumannii* αποικίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους των ασθενών και τον περιβάλλοντα χώρο τους (64, 65). Ο αποικισμένος ασθενής θεωρείται γενικά η πηγή από την οποία ο οργανισμός διασπείρεται στο τοπικό περιβάλλον και σε άλλους ασθενείς, για παράδειγμα μέσω του αέρα, των χεριών του προσωπικού ή του μολυσμένου εξοπλισμού (56, 66, 67). Η ικανότητα του μικροοργανισμού να ανθίσταται στους χημικούς παράγοντες και την αποξήρανση θεωρείται σημαντικό χαρακτηριστικό για την επιβίωσή του στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Ωστόσο, το φυσικό περιβάλλον από το οποίο προέρχονται το *A. baumannii* και το *A. nosocomialis* παραμένει ακόμη και σήμερα ασαφές.

2. Μέθοδοι για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter*

2.1. Εμπορικά συστήματα

Στα εργαστήρια ρουτίνας, η ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* γίνεται κυρίως με χειροκίνητα, ημιαυτόματα και αυτόματα εμπορικά συστήματα, όπως τα συστήματα API 20NE, Vitek 2, Phoenix και MicroScan WalkAway. Το σύστημα Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) χρησιμοποιεί ειδικά σχεδιασμένες κάρτες που περιέχουν κοιλότητες, είτε με αφυδατωμένα υποστρώματα για την ταυτοποίηση των ειδών ή αφυδατωμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες για τον έλεγχο της ευαισθησίας. Ένα πρότυπο ελαιώρημα του στελέχους παρασκευάζεται και προστίθεται στις κοιλότητες της κάρτας. Η επώαση, η ανάγνωση και η ερμηνεία της κάρτας γίνονται αυτόματα από ένα ηλεκτρονικό σύστημα. Το σύστημα επιτρέπει την ταχεία ταυτοποίηση των ειδών μέσα σε 5-8 ώρες.

Ωστόσο, η ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* με τα εμπορικά συστήματα είναι προβληματική (14, 68, 69). Αυτό μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στην περιορισμένη βάση δεδομένων που διαθέτουν τα συστήματα αυτά, αλλά και στο γεγονός ότι τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών δεν είναι ειδικά σχεδιασμένα για την ταυτοποίηση των *Acinetobacter*. Ειδικότερα, τα τρία κλινικά σημαντικά μέλη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex δεν μπορούν να διαχωριστούν από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα ταυτοποίησης. Στην πραγματικότητα, τα είδη *A. baumannii*, *A. pittii* και *A. nosocomialis* έχουν τόσες πολλές ομοιότητες μεταξύ τους με αποτέλεσμα να ταυτοποιούνται ως ενιαία οντότητα και συγκεκριμένα ως *A. baumannii* από τα συστήματα αυτά. Ως εκ τούτου, θεωρείται σκόπιμο

κατά την αναφορά στα εν λόγω είδη να χρησιμοποιείται ο όρος *A. baumannii* group αντί για *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex (14).

Η αναγκαιότητα για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* στα κλινικά εργαστήρια ρουτίνας έχει αμφισβητηθεί στο παρελθόν (14). Από κλινική άποψη, είναι οπωσδήποτε απαραίτητο να γίνεται διάκριση μεταξύ των ειδών του *A. baumannii* group και των *Acinetobacter* που δεν ανήκουν στο *A. baumannii* group, καθώς τα πρώτα εμφανίζουν αντοχή σε πολλά αντιμικροβιακά και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις. Από την άλλη, πιο πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι και η ορθή αναγνώριση των διαφόρων ειδών εντός του *A. baumannii* group έχει μεγάλο ενδιαφέρον, διότι οι λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτούς τους μικροοργανισμούς έχουν διαφορετική κλινική έκβαση ανάλογα με το είδος και, ως εκ τούτου, απαιτούν διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις και διαχείριση (70, 71). Τέλος, από ερευνητική σκοπιά η χρήση κατάλληλων μεθόδων για την ταυτοποίηση των ειδών του *Acinetobacter* (συμπεριλαμβανομένων κι εκείνων που απαρτίζουν το *A. baumannii* group) είναι απαραίτητη για τη διεύρυνση των γνώσεων μας σχετικά με την επιδημιολογία, την παθογένεια και τις κλινικές επιπτώσεις των διαφόρων ειδών.

Μια αναδυόμενη και υποσχόμενη μέθοδος που χρησιμοποιείται, επίσης, στα μικροβιολογικά εργαστήρια ρουτίνας είναι η φασματομετρία μάζας και συγκεκριμένα η μέθοδος MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση μάζας μορίων που έχουν μετατραπεί σε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Για κάθε είδος δημιουργείται ένα ειδικό φάσμα μάζας, το οποίο μπορεί να συγκριθεί με μια ηλεκτρονική βάση δεδομένων. Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτοποίηση των ειδών σε λιγότερο από μία ώρα, αλλά απαιτεί ακριβό εξοπλισμό. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η MALDI-TOF MS είναι αξιόπιστη μέθοδος για την ταυτοποίηση των ειδών του *A. baumannii* group (72, 73). Ωστόσο, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η MALDI-TOF MS απέτυχε να ταυτοποιήσει σωστά τα διάφορα είδη του γένους, εκτός από το *A. baumannii*, για το οποίο έδωσε καλά αποτελέσματα (74). Ως εκ τούτου, περαιτέρω βελτιώσεις της βάσης δεδομένων είναι απαραίτητες, καθώς και νέες μελέτες για την αξιολόγηση της απόδοσης, των πλεονεκτημάτων και των περιορισμών της μεθόδου.

2.2. Μοριακές τεχνικές

Η μέθοδος αναφοράς για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* είναι ο υβριδισμός των νουκλεϊνικών οξέων (DNA-DNA hybridization) (22, 75), που βασίζεται στον

προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως του υβριδοποιημένων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Ωστόσο, η μέθοδος είναι πολύ επίπονη και συνεπώς μη πρακτική για τη συνήθη ταυτοποίηση των ειδών σε επίπεδο ρουτίνας.

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί διάφορες μέθοδοι για την ταυτοποίηση των *Acinetobacter* σε επίπεδο είδους, οι οποίες βασίζονται στην ανάλυση θραυσμάτων DNA. Σε αυτές περιλαμβάνονται η μελέτη πολλαπλασιασμένου ριβοσωμικού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού (Amplified rDNA restriction analysis, ARDRA) (76), ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων θραυσμάτων (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) (49, 77), η ριβοτυπία (78), η ανάλυση αποτυπώματος tRNA (tRNA spacer fingerprinting) (79) και η περιοριστική ανάλυση των διάμεσων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ των γονιδίων 16S rDNA και 23S rDNA (restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences) (80). Μεταξύ αυτών, οι πιο ευρέως αποδεκτές μέθοδοι, οι οποίες θεωρούνται αξιόπιστες για την ταυτοποίηση όλων των ειδών του γένους είναι η ARDRA και η AFLP, αλλά η χρήση τους περιορίζεται επί του παρόντος σε λίγα εξειδικευμένα εργαστήρια αναφοράς.

Επίσης, η αλληλούχιση αρκετών αλληλουχιών DNA έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter*. Σε αυτές περιλαμβάνονται η αλληλουχία 16S rDNA (81), η αλληλουχία μεταξύ των γονιδίων που κωδικογραφούν για 16S rRNA και 23S rRNA (82), η αλληλουχία του *recA* γονιδίου, το οποίο κωδικογραφεί τη ρεκομπινάση A (83), η αλληλουχία του *gyrB* γονιδίου που κωδικογραφεί για τη β-υπομονάδα της DNA γυράσης (84), η αλληλουχία του *rpoB* γονιδίου που κωδικογραφεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης (85) και η αλληλουχία του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} (86).

Μια απλή μέθοδος για να γίνει διάκριση μεταξύ των ειδών *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis* και *A. pittii* είναι η πολυπλεκτική (multiplex) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) για το γονίδιο *gyrB*, η οποία προτάθηκε πρόσφατα από τον Higgins *et al.* (87, 88). Η μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση διακριτών τμημάτων του γονιδίου *gyrB* με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών για τα συγκεκριμένα είδη, οπότε προκύπτουν συγκεκριμένα μεγέθη θραυσμάτων για κάθε είδος που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση.

Η ανάλυση ενός τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου *rpoB* έχει βρεθεί ότι είναι μία πολύ αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδος για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter*, λόγω του πολυμορφισμού που εμφανίζει το γονίδιο αυτό (58, 85, 89). Ειδικότερα, ο La Scola *et al.* προσδιόρισαν δύο μεταβλητές περιοχές εντός του γονιδίου, οι οποίες πλαισιώνονται από συντηρημένες αλληλουχίες (85). Η αλληλούχιση αυτών των

μεταβλητών περιοχών (350-450 bp) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ των ειδών *Acinetobacter*.

Η ανίχνευση του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} με PCR έχει προταθεί από την Turton *et al.* ως μία εύκολη μέθοδος διαλογής (screening) για την ταυτοποίηση του *A. baumannii* (86). Το γονίδιο κωδικογραφεί για την OXA-51 οξακιλλινάση της τάξης D των β-λακταμασών, που θεωρείται ότι βρίσκεται ενδογενώς στο χρωμόσωμα όλων των *A. baumannii* κι άρα έχει εξαιρετική ειδικότητα για το είδος. Ωστόσο, σύμφωνα με μεταγενέστερες μελέτες η μέθοδος παρουσίασε σε λίγες περιπτώσεις στελεχών ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι η ανίχνευση του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} δεν ήταν αξιόπιστη για την ταυτοποίηση του *A. baumannii*, επειδή το γονίδιο μπορεί να διαταραχθεί από αλληλουχίες εισδοχής IS*Aba* ή ότι το γονίδιο θα μπορούσε να αποκτηθεί από non-*A. baumannii* στελέχη μέσω της οριζόντιας μεταφοράς (57, 90–92). Σε γενικές γραμμές όμως, η μέθοδος παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα και η ανίχνευση του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} είναι θετική ή αρνητική στα στελέχη που έχουν αναγνωριστεί ως *A. baumannii* ή non-*A. baumannii*, αντίστοιχα, με άλλες μοριακές μεθόδους, γεγονός που ενισχύει την αξία της μεθόδου ως δείκτη για την ταυτοποίηση του *A. baumannii* (68, 72, 93).

3. Η κλινική σημασία του *A. baumannii*

Η κλινική σημασία του *A. baumannii* οφείλεται, ως επί το πλείστον, στην ικανότητά του να αποκτά εύκολα αντοχή σε διαφορετικές ομάδες αντιμικροβιακών ουσιών και να επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ξηρές επιφάνειες (94), γεγονός που ενισχύει την παραμονή και τη διασπορά του στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Ως εκ τούτου, η Αμερικάνικη Εταιρεία Λοιμωδών Νοσημάτων (IDSA) έχει συμπεριλάβει το *A. baumannii* στον κατάλογο των έξι ιδιαίτερα ανθεκτικών παθογόνων που ονομάζεται ομάδα ESKAPE (ακρωνύμιο που αντιπροσωπεύει τα είδη *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter* spp.) (95).

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC) στη μελέτη του σημειακού επιπολασμού των νοσοκομειακών λοιμώξεων και της χρήσης αντιβιοτικών, η οποία διεξήχθη το 2011-2012, ανέφερε ότι το *Acinetobacter* spp. ήταν υπεύθυνο για το 4,3% των μικροβιαϊμών και το 3,6% του συνόλου των νοσοκομειακών λοιμώξεων (96). Η ποσοστιαία αναλογία της συμμετοχής του *A. baumannii* στις νοσοκομειακές λοιμώξεις εμφάνισε μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με τη χώρα, με την Ελλάδα να εμφανίζει το

υψηλότερο ποσοστό (16,8%). Σύμφωνα με το εθνικό σχέδιο δράσης “Προκρούστης” για την επιτήρηση και τον έλεγχο διασποράς ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Gram-αρνητικών παθογόνων (*Klebsiella*, *Pseudomonas* και *Acinetobacter*), το οποίο εφαρμόζεται από το 2010 από το Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), το *Acinetobacter* ήταν το δεύτερο σε συχνότητα παθογόνο μετά την *Klebsiella* που απομονώθηκε από βακτηριακές νοσηλεύμενων ασθενών, το 2013. Επίσης, δεδομένα από το εθνικό δίκτυο μελέτης της μικροβιακής αντοχής [WHONET, (<http://www.mednet.gr/whonet/>)] σχετικά με τα ποσοστά όλων των παθογόνων που απομονώθηκαν από μικροβιακές στις Ελληνικές ΜΕΘ, το 2014, κατέδειξαν ότι το *A. baumannii* κατέχει την πρώτη θέση με ποσοστό 14,4%.

Το *A. baumannii* μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις, όπως πνευμονία, μικροβιαμία, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων και λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος. Ωστόσο, ο αποικισμός είναι γενικά πιο συχνός από τη λοίμωξη (14, 56), αν και η διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των δύο καταστάσεων μπορεί να είναι δύσκολη σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Ο βαθμός που ο οργανισμός συμβάλλει στη θνητότητα των λοιμώξεων αποτελεί ερώτημα που συνεχώς απασχολεί την επιστημονική κοινότητα (97). Σε γενικές γραμμές, τα ποσοστά νοσηρότητας, θνητότητας και θνησιμότητας διαφέρουν σημαντικά στη βιβλιογραφία.

Ο ασθενείς υψηλού κινδύνου για την απόκτηση *A. baumannii* είναι οι σοβαρά πάσχοντες, οι οποίοι νοσηλεύονται στη ΜΕΘ, στις μονάδες εγκαυμάτων και στις μονάδες φροντίδας νεογνών. Επίσης, τα τελευταία χρόνια έχει προκύψει μια ειδική κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει ασθενείς με σοβαρά τραύματα, όπως τραυματίες κατά τη διάρκεια πολέμων (98, 99) ή φυσικών καταστροφών (100), που είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά *A. baumannii*.

4. Μοριακές μέθοδοι για την επιδημιολογική τυποποίηση του *A. baumannii*

Διάφορες μέθοδοι μοριακής τυποποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιδημιολογική διερεύνηση της κλωνικότητας των στελεχών *A. baumannii* σε τοπικό, εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα για τη γονοτύπηση των στελεχών *A. baumannii* είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE), η AFLP, η μελέτη του πολυμορφισμού διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (Multilocus variable number tandem repeat analysis, MLVA), η τυποποίηση με αλληλούχιση πολλαπλών

γενετικών τύπων (Multilocus sequence typing, MLST), διάφορες άλλες μέθοδοι που βασίζονται στην PCR και την ανάλυση της αλληλουχίας (PCR-based and sequence-based methods) και η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole-genome sequencing, WGS) (101). Οι μέθοδοι αυτές περιγράφονται στη συνέχεια, δίνοντας έμφαση κυρίως σε εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

4.1. Μέθοδοι αποτυπωμάτων DNA (DNA fingerprinting methods)

Παρά την εμφάνιση νέων μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχιση, η PFGE εξακολουθεί να θεωρείται ο χρυσός κανόνας για τις επιδημιολογικές έρευνες των στελεχών *A. baumannii* (101). Η μέθοδος χρησιμοποιείται, κυρίως, για την ανάλυση των επιδημιών και την επιδημιολογική διερεύνηση σε τοπικό επίπεδο (π.χ. νοσοκομείο) και σε καθορισμένο χρονικό διάστημα, ενώ αποτελεί σημαντικό συμπληρωματικό εργαλείο για την επιδημιολογική διερεύνηση μεγάλης κλίμακας. Με τη μέθοδο αυτή το γονιδιωματικό DNA κόβεται με ένα ένζυμο περιορισμού σε σπάνιες θέσεις, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σχετικά μεγάλα θραύσματα, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγορόζης με περιοδική εναλλαγή της γωνίας της κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου. Η τεχνική επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλων θραυσμάτων έως και 1000 kb. Η επιλογή των ενζύμων περιορισμού αποτελεί βασικό παράγοντα στη διαδικασία της PFGE, καθώς μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των αποτελεσμάτων, την ανάλυση και την επαναληψιμότητα (102). Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα περιορισμού είναι το *ApaI* (103, 104) και ακολουθεί το *SmaI* (105). Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα της PFGE που προκύπτουν με τα ένζυμα *SmaI* και *ApaI* είναι σύμφωνα, αν και το *SmaI* δείχνει ελαφρώς χαμηλότερη διακριτική ικανότητα από εκείνη του *ApaI* (106, 107). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PFGE έχουν θεσπιστεί κριτήρια από τον Tenover *et al.* (108) με τη βοήθεια των οποίων γίνεται σύγκριση των διαφορών των ηλεκτροφορητικών προτύπων των στελεχών. Τα στελέχη θεωρούνται ότι συνδέονται επιδημιολογικά εάν ο αριθμός των διαφορών στις ζώνες (μπάντες) των ηλεκτροφορητικών προτύπων είναι ≤ 6 . Η σύγκριση των προφίλ PFGE μπορεί να γίνει και με ψηφιακή, ηλεκτρονική ανάλυση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η υψηλή διακριτική ικανότητα, ενώ τα μειονεκτήματά της ότι είναι ακριβή, πολύπλοκη και χρονοβόρα. Επίσης, υπάρχουν πολλά διαφορετικά πρωτόκολλα για την ανάλυση των *A. baumannii* με PFGE, γεγονός που παρεμποδίζει τις διεργαστηριακές συγκρίσεις. Σε μια πολυκεντρική μελέτη, στην οποία διερευνήθηκε η ενδο- και διεργαστηριακή επαναληψιμότητα στελεχών *A. baumannii* χρησιμοποιώντας μια αυστηρή διαδικασία προτύπωσης PFGE με περιοριστικό

ένζυμο *ApaI*, η ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα ήταν 95%, ενώ η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα 87% (103).

Άλλες μέθοδοι τυποποίησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιδημιολογική διερεύνηση ευρείας κλίμακας είναι η MLVA και η AFLP. Η MLVA είναι μέθοδος τυποποίησης υψηλής ανάλυσης που μελετά πολυμορφισμούς επαναλαμβανόμενων χρωμοσωμικών αλληλουχιών, ενώ η AFLP βασίζεται στην ανάλυση του αποτυπώματος του DNA που προκύπτει από επιλεκτικό πολλαπλασιασμό με ειδικούς εκκινητές μετά από κατατεμαχισμό ολόκληρου του γονιδιώματος σε ειδικές θέσεις (109–112). Οι τελευταίες μέθοδοι είναι τεχνικά πιο απαιτητικές και δαπανηρές σε σχέση με την PFGE και η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων δύσκολη. Ωστόσο, η ανάλυση AFLP έχει υιοθετηθεί ως μέθοδος αναφοράς για την αναγνώριση των κύριων επιδημικών κλώνων *A. baumannii*, οι οποίοι αρχικά ονομάστηκαν Ευρωπαϊκοί κλώνοι (EU) I, II, III, αλλά πλέον θεωρούνται ως διεθνείς κλώνοι (International clones, ICs) I, II, III (ή εναλλακτικά 1, 2, 3) (56, 109).

4.2. Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR και την ανάλυση της αλληλουχίας

Οι μέθοδοι τυποποίησης που βασίζονται στην PCR και την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι πλέον οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες και θεωρούνται κατάλληλες για τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών *A. baumannii* και για μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες.

Η μέθοδος τυποποίησης DiversiLab™ είναι μια αυτοματοποιημένη τεχνική, η οποία βασίζεται στην ενίσχυση διάσπαρτων εξωγονιδιακών επαναληπτικών αλληλουχιών του γονιδιώματος με PCR (repetitive extragenic palindromic PCR, rep-PCR). Η μέθοδος είναι σε θέση να εντοπίσει οκτώ διαφορετικούς κλώνους με παγκόσμια κατανομή, συμπεριλαμβανομένων και των διεθνών κλώνων I-III (113, 114).

Μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση ενός γενετικού τύπου, όπως των γονιδίων *rpoB* (89), *gyrB* (88) ή *bla_{OXA-51-like}* (115), και την ακόλουθη ανάλυση της αλληλουχίας έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας.

Το γονίδιο *bla_{OXA-51-like}* είναι μία ενδογενής β-λακταμάση τάξης D, η οποία φυσιολογικά υπάρχει στο χρωμόσωμα όλων των στελεχών *A. baumannii* (116). Μετά την πρώτη ανίχνευση του γονιδίου αυτού εντοπίστηκαν διάφορες παραλλαγές του με αποτέλεσμα να σχηματιστεί μία ευρεία ομάδα β-λακταμασών, η οποία περιλαμβάνει σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη 95 ένζυμα (117). Η αρχική και παράλληλα πιο σημαντική εφαρμογή του

γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} είναι η χρήση του στη μοριακή ταυτοποίηση του *A. baumannii* σε επίπεδο είδους με την απλή ανίχνευσή του με PCR (86). Μεταγενέστερα, διάφορες μελέτες ερευνήσαν τη χρησιμότητα της αλληλούχησης του *bla*_{OXA-51-like} στην τυποποίηση (*bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing, SBT). Ο Evans *et al.* (118) ανέλυσαν 60 στελέχη *A. baumannii* που συλλέχθηκαν από διάφορα νοσοκομεία σε όλο τον κόσμο με τις τεχνικές PFGE, 3LST (Trilocus sequence-based typing) και SBT. Αυτό που βρέθηκε ήταν ότι η πλειοψηφία των στελεχών που ανήκαν στους Ευρωπαϊκούς κλώνους I, II και III έφεραν τα ένζυμα OXA-69, OXA-66 και OXA-71, αντίστοιχα. Επίσης, ο Hamouda *et al.* (115) ανέφεραν καλή συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθόδων MLST (σχήμα Oxford) και SBT, αν και η PFGE εμφάνισε μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με τις δύο προηγούμενες μεθόδους. Έτσι λοιπόν προτάθηκε για την επιδημιολογική διερεύνηση των στελεχών *A. baumannii*, αρχικά να χρησιμοποιείται η αλληλούχηση του *bla*_{OXA-51-like} σαν μέθοδος διαλογής για την ταξινόμηση των στελεχών στους τρεις Ευρωπαϊκούς κλώνους κι έπειτα να ακολουθεί η ανάλυση με MLST. Στη συνέχεια, η κλωνική συγγένεια των στελεχών που ανήκουν στον ίδιο κλώνο μπορεί να διερευνηθεί με τη βοήθεια της μεθόδου PFGE. Ακόμη, σύμφωνα με μία άλλη μελέτη παρατηρήθηκε στενή συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} και των οκτώ διεθνών κλώνων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο rep-PCR (DiversiLab) (114). Ο Pournaras *et al.* (119) αξιολόγησαν την ικανότητα του σχήματος SBT να σχετίζεται με τους ST (sequence type) τύπους που προέκυψαν από την ανάλυση με τη μέθοδο MLST (σχήμα Pasteur) σε 585 πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*. Όλα τα στελέχη τυποποιήθηκαν σωστά και ταξινομήθηκαν στους αντίστοιχους ST τύπους και τα κλωνικά συμπλέγματα (Clonal Complexes, CCs). Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η μέθοδος τυποποίησης SBT είναι πολύ χρήσιμη για την ταξινόμηση των στελεχών *A. baumannii* στους κατάλληλους κλώνους, δεδομένου ότι είναι γρήγορη, εύκολη και φθηνή.

Το σχήμα 3LST περιλαμβάνει την ενίσχυση και αλληλούχηση τριών πολυμορφικών γενετικών τόπων, που βρίσκονται υπό εξελικτική πίεση επιλογής. Έτσι, η μέθοδος προσφέρει περισσότερες πληροφορίες στη διερεύνηση επιδημιών σε σχέση με την MLST, η οποία μελετά γενετικώς σταθερά, “housekeeping” γονίδια. Τα γονίδια που μελετιούνται είναι το *ompA* (κωδικογραφεί την εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη A), το *csuE* (τμήμα του *csu* οπερονίου που σχετίζεται με τη συναρμολόγηση ινιδίων και τη δημιουργία βιομεμβράνης) και το *bla*_{OXA-51-like}. Η μέθοδος έχει συχνά χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση επιδημικών στελεχών *A. baumannii*, τα οποία ταξινομούνται σε έξι διαφορετικά sequence groups (SGs) 1–6 που αντιστοιχούν στους προσδιοριζόμενους με άλλες μεθόδους διεθνείς κλώνους (120–122). Η βάση δεδομένων αυτού του σχήματος τυποποίησης για το *A. baumannii* βρίσκεται

στον ιστότοπο www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php.

Προκειμένου να ξεπεραστεί ο περιορισμός της έλλειψης ειδικού εξοπλισμού για την αλληλούχιση στα διάφορα εργαστήρια, δύο multiplex PCRs έχουν σχεδιαστεί για την ταχεία ταυτοποίηση των τριών διεθνών κλώνων. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο ομάδες εκκινητών PCR (ομάδα 1 και 2 ή group 1 και 2) για την επιλεκτική ενίσχυση των γονιδίων *ompA*, *csuE* και *bla_{OXA-51-like}*. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τον ταχύ διαχωρισμό των στελεχών στις ομάδες (sequence groups, G_S) 1-3 και 6 (120, 122) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος διαλογής για την προκαταρκτική τυποποίηση στις επιδημιολογικές μελέτες. Έτσι, όλα τα στελέχη που ανήκουν στον διεθνή κλώνο II ή G1 χαρακτηρίζονται από την ενίσχυση των θραυσμάτων των τριών τόπων της ομάδας 1 PCR, αλλά όχι της ομάδας 2. Τα στελέχη που ανήκουν στον διεθνή κλώνο I ή G2 εμφανίζουν τα θραύσματα των τριών τόπων της ομάδας 2 PCR, αλλά όχι της ομάδας 1. Τα στελέχη του διεθνούς κλώνου III ή G3 φέρουν τα θραύσματα *csuE* και *bla_{OXA-51-like}* της ομάδας 1 και το *ompA* της ομάδας 2 PCR (120). Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος παράγει σύμφωνα αποτελέσματα με αυτά άλλων τεχνικών και ειδικά με την MLST, αλλά έχει μικρότερη διακριτική ικανότητα από την PFGE (123).

Η μέθοδος MLST είναι μία από τις πιο επιτυχημένες και ευρέως αποδεκτές τεχνικές τυποποίησης, η οποία αποτελεί πρότυπο (“gold standard”) για την πληθυσμιακή ανάλυση και την επιδημιολογική διερεύνηση ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η μέθοδος συγκρίνει τις αλληλουχίες εσωτερικών τμημάτων επτά γονιδίων του βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes) που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη *Acinetobacter*. Τα γονίδια που παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά αλληλία. Κάθε στέλεχος διαθέτει ένα συνδυασμό επτά αλληλίων (allelic profile, αλληλικό προφίλ) και κατατάσσεται σε ένα ST τύπο. Οι ST τύποι που διαφέρουν σε ένα από τα επτά γονίδια θεωρούνται Single Locus Variants (SLV), ενώ οι τύποι που διαφέρουν σε δύο γονίδια θεωρούνται Double Locus Variants (DLV). Τα στελέχη που έχουν όμοια τουλάχιστον πέντε από τα επτά αλληλία ομαδοποιούνται στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα (Clonal Complex, CC).

Για τα *Acinetobacter* υπάρχουν δύο σχήματα MLST, τα οποία έχουν την ικανότητα να τυποποιούν τόσο τα στελέχη *A. baumannii* όσο και τα non-*A. baumannii*: το σχήμα Oxford και το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur (124–126) που μελετούν τρεις κοινούς γενετικούς τύπους. Οι βάσεις δεδομένων MLST και των δύο σχημάτων διατίθενται στον ιστότοπο <http://pubmlst.org/abaumannii/>. Το σχήμα Oxford αρχικά περιγράφηκε από τον Bartual *et al.* (MLST^B) (124) και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Wisplinghoff *et al.*

(125). Βασίζεται στον πολλαπλασιασμό και αλληλούχιση των γονιδίων *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* και *rpoD*. Σήμερα, στη βάση δεδομένων της MLST^B περιλαμβάνονται 1475 διακριτοί ST τύποι στελεχών *Acinetobacter*. Πιο πρόσφατα, περιγράφηκε από τον Diancourt *et al.* (126) το σχήμα MLST του ινστιτούτου Pasteur (MLST^P), το οποίο βασίζεται στην αλληλούχιση των γονιδίων *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* και *rpoB*. Επί του παρόντος, η βάση δεδομένων MLST^P περιλαμβάνει 950 διαφορετικούς ST τύπους *Acinetobacter*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, συνήθως υπάρχει συμφωνία μεταξύ των δύο σχημάτων, αν και γενικά οι δημοσιεύσεις που μελετούν και τα δύο σχήματα είναι περιορισμένες (127–129). Επιπλέον, μια δημοσίευση έδειξε ότι το σχήμα Oxford αδυνατεί να τυποποιήσει μερικά στελέχη, λόγω του ανασυνδυασμού που λαμβάνει χώρα στα γονίδια *gyrB* και *gpi* και επομένως τα γονίδια αυτά είναι ακατάλληλα για φυλογενετικές μελέτες (115). Από την άλλη πλευρά, μια πολύ πρόσφατη μελέτη του 2016 έδειξε ότι και τα δύο σχήματα MLST είναι πολύτιμα εργαλεία για πληθυσμιακές μελέτες. Όπως ανέφεραν οι συγγραφείς, το σχήμα Oxford εμφανίζει υψηλότερη διακριτική ικανότητα που οφείλεται, κυρίως, στα γονίδια *gyrB* και *gpi* και άρα θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανάλυση επιδημιών σε τοπικό επίπεδο, σε αντίθεση με το σχήμα Pasteur (130).

Μια νεότερη τεχνική που θεωρείται παραλλαγή της MLST είναι η PCR/ESI-MS (Multilocus PCR/electrospray ionization mass spectrometry). Βασίζεται στην ίδια αρχή με την MLST, δηλαδή στον πολλαπλασιασμό πολλαπλών γενετικών τόπων με PCR, με τη διαφορά ότι η ανάλυση των προϊόντων εκτελείται με φασματομετρία μάζας αντί της παραδοσιακής αλληλούχισης. Η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται ακόμη ευρέως, πιθανότατα λόγω του ειδικού και δαπανηρού εξοπλισμού που απαιτεί (131, 132).

4.3. Ανάλυση αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος

Τα τελευταία χρόνια, με την εισαγωγή των νέων τεχνολογιών αλληλούχισης υψηλής απόδοσης οι αλληλουχίες γονιδιωμάτων πολλών στελεχών *A. baumannii*, συμπεριλαμβανομένων και των διεθνών επιδημικών κλώνων, έχουν αναλυθεί. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους τυποποίησης, το WGS μπορεί να αποκρυπτογραφήσει όλες τις πληροφορίες που υπάρχουν στο βακτηριακό γονιδίωμα και έτσι μπορεί να εφαρμοστεί σε τοπικές επιδημίες, παγκόσμιας κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες και πληθυσμιακές μελέτες (133–135). Το WGS μπορεί να ανιχνεύσει γενετικές αλλαγές μεταξύ πολύ συγγενικών στελεχών, όπως είναι οι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και οι ενθέσεις ή ελλείψεις

(INDEL), που προκαλούνται από την πίεση επιλογής των αντιβιοτικών. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα να διερευνηθούν και να εντοπιστούν χρήσιμα γονίδια στο βακτηριακό γονιδίωμα, όπως γονίδια αντοχής συμπεριλαμβανομένων και των νησιδίων αντοχής, γονίδια που σχετίζονται με την παθογονικότητα και επιπλέον άλλες αλληλουχίες του γονιδιώματος που ενδεχομένως μπορούν να εξηγήσουν την εκδήλωση διαφόρων φαινοτύπων (136–138). Ακόμη, οι μελέτες που χρησιμοποιούν την προσέγγιση WGS παρέχουν νέες γνώσεις που βοηθούν στην κατανόηση της δυναμικής των επιδημιών στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Έτσι μπορούμε να αντλήσουμε χρήσιμες πληροφορίες για το παθογόνο αίτιο και τις συνθήκες που ευνοούν την ανάδυσή του μέσα στο νοσοκομείο, καθώς και την πιθανή πηγή και την πορεία μετάδοσης της επιδημίας. Άλλα ερωτήματα που μπορούν να απαντηθούν σχετίζονται με το μηχανισμό που ευνοεί τη διασπορά του παθογόνου, αν δηλαδή πρόκειται για οριζόντια μεταφορά γονιδίων, ανασυνδυασμό ή μετάλλαξη και πώς συγκεκριμένα γονίδια αντοχής εξελίσσονται κατά τη διάρκεια της επιδημίας (134, 135). Έτσι, η καλύτερη κατανόηση της εξέλιξης ενός παθογόνου μπορεί να χρησιμεύσει στη διάγνωση, τη θεραπεία και να βοηθήσει στην άμεση εφαρμογή μέτρων ελέγχου και πρόληψης των λοιμώξεων.

Σήμερα, η διαθεσιμότητα των τεχνικών αλληλούχησης νέας γενιάς στο εργαστήριο είναι ακόμη περιορισμένη, λόγω του υψηλού κόστους. Ωστόσο, οι επιστήμονες πιστεύουν ότι η τεχνική WGS θα αποτελέσει τον “χρυσό κανόνα” και την κύρια μέθοδο τυποποίησης στο άμεσο μέλλον.

5. Έλεγχος ευαισθησίας του *A. baumannii* στα αντιμικροβιακά

5.1. Όρια ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεγάλοι οργανισμοί που καθορίζουν τα κλινικά όρια ευαισθησίας, όπως το Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) και η European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), έχουν διαφορετικά όρια ευαισθησίας για αρκετά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των λοιμώξεων από το *A. baumannii* (όπως φθοριοκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και δοριπενέμη). Επί του παρόντος, η EUCAST παρέχει όρια ευαισθησίας στα *Acinetobacter* spp. για καρβαπενέμες (δοριπενέμη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη), φθοριοκινολόνες (σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη), αμινογλυκοσίδες (αμικασίνη, γενταμικίνη, νετιλμικίνη, τομπραμυκίνη), κολιστίνη και τριμεθοπρίμη/ σουλφαμεθοξαζόλη (κοτριμοξαζόλη) (139). Το CLSI παρέχει επιπλέον όρια ευαισθησίας για

πενικιλίνες (αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ), κεφαλοσπορίνες (κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη) και τετρακυκλίνες (τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη, μινοκυκλίνη) (140). Επίσης, ούτε η EUCAST, ούτε το CLSI ή ο Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (U.S. FDA) έχουν θεσπίσει όρια ευαισθησίας για την τιγεκυκλίνη έναντι του *A. baumannii*.

5.2. Μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας και ερμηνεία του αντιβιογράμματος

Ο αξιόπιστος έλεγχος ευαισθησίας στα διάφορα αντιβιοτικά στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια έχει μεγάλη σημασία για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής από τους κλινικούς ιατρούς και την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από στελέχη *Acinetobacter* spp. Η EUCAST προτείνει ο έλεγχος της ευαισθησίας έναντι των *Acinetobacter* spp. να γίνεται με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων σε άγαρ (disk diffusion, DD), εκτός από την κολιστίνη για την οποία απαιτείται η χρήση μίας μεθόδου που βασίζεται στον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimal Inhibitory Concentration, MIC). Σύμφωνα με το CLSI οι προτυποποιημένες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ευαισθησίας των αντιμικροβιακών ουσιών έναντι των διαφόρων ειδών του *Acinetobacter* είναι η μέθοδος DD, η μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό (broth microdilution, BMD) και η μέθοδος αραιώσεων σε άγαρ (agar dilution, AD). Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η ερμηνεία του αντιβιογράμματος είναι δύσκολη, ενώ δεν υπάρχει πλήρης συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων μεθόδων, ακόμη και μεταξύ των πρότυπων. Όταν ο Swenson *et al.* αξιολόγησαν τη μέθοδο DD χρησιμοποιώντας ως μέθοδο αναφοράς την BMD, εντόπισαν σημαντικά προβλήματα στον έλεγχο των β-λακταμών (141). Έτσι για παράδειγμα, κατά τον προσδιορισμό των MICs σε ζωμό, μπορεί να παρατηρηθεί ανάπτυξη πολύ μικρών αποικιών σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτή που αντιστοιχεί στο πρώτο βαθμίο με προφανή αναστολή της ανάπτυξης, γεγονός που δυσχεραίνει την τελική εκτίμηση της MIC. Επίσης, η μέθοδος DD παρήγαγε ψευδώς ευαίσθητα αποτελέσματα σε σχέση με τη μέθοδο BMD για τα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό, κεφταζιδίμη και κεφεπίμη, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντικές διεργαστηριακές διακυμάνσεις, ιδιαίτερα για την κεφεπίμη. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα με τη μέθοδο DD για τις καρβαπενέμες, τις αμινογλυκοσίδες, τις φθοριοκινολόνες και την κοτριμοξαζόλη.

Ο προσδιορισμός των MICs σε επίπεδο ρουτίνας στα μικροβιολογικά εργαστήρια

βασίζεται κυρίως σε εμπορικές μεθόδους, όπως η μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης (gradient diffusion) με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού [π.χ. Etest (bioMérieux)] και τα αυτοματοποιημένα συστήματα (π.χ. Vitek 2, BD Phoenix, Microscan). Τα συστήματα αυτά που εφαρμόζουν παραλλαγές της μεθόδου μικροαραιώσεων σε ζωμό χρησιμοποιούνται από την πλειοψηφία των μικροβιολογικών εργαστηρίων λόγω της αποτελεσματικότητας και της ευκολίας στη χρήση τους (142). Ωστόσο, η απόδοση των παραπάνω μεθόδων δεν έχει αξιολογηθεί πλήρως. Στη συνέχεια, θα περιγραφούν τα πλεονεκτήματα και τα προβλήματα που παρουσιάζουν οι διάφορες μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας σε σημαντικά αντιβιοτικά για τη θεραπεία του *A. baumannii*, όπως η αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη, οι καρβαπενέμες, η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη/μινοκυκλίνη.

Αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη. Η αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη έχει κλινικά σημαντική ενδογενή δράση έναντι του *A. baumannii* που οφείλεται στη δράση της σουλμπακτάμης. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος προσδιορισμού της ευαισθησίας της, ενώ όρια ευαισθησίας έχουν θεσπιστεί μόνο από το CLSI. Το Etest έχει βρεθεί ότι αποδίδει χαμηλότερες MICs από τη μέθοδο AD και συχνά είναι δύσκολη η αξιολόγησή του (143), ενώ η μέθοδος DD πρέπει να αποφεύγεται. Ο έλεγχος ευαισθησίας με τα αυτόματα μηχανήματα δεν έχει αξιολογηθεί.

Καρβαπενέμες. Όσον αφορά στις καρβαπενέμες, το 2014 το CLSI αναθεώρησε τα όρια ευαισθησίας για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη, οπότε υπάρχει πλέον σε μεγάλο βαθμό συναίνεση μεταξύ της EUCAST και του CLSI για τα *Acinetobacter* spp. (144). Για τη δοριπενέμη, όμως, εξακολουθεί να υπάρχει διαφορά στα όρια ευαισθησίας μεταξύ της EUCAST και του CLSI. Αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί σε σημαντικά ποσοστά σφαλμάτων που προκύπτουν κατά τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στις καρβαπενέμες έναντι των στελεχών *Acinetobacter* με τα αυτοματοποιημένα μηχανήματα. Σε γενικές γραμμές όμως, τα προβλήματα αυτά αφορούν κυρίως το Microscan, για το οποίο έχουν αναφερθεί υψηλά ποσοστά ψευδώς ευαίσθητων στελεχών (145–148). Έτσι λοιπόν, ο Kulah *et al.* συνέστησαν στα κλινικά εργαστήρια που χρησιμοποιούν το σύστημα MicroScan να επικυρώνουν την ευαισθησία στην ιμιπενέμη με τη χρήση μιας δεύτερης ανεξάρτητης μεθόδου (όπως το Etest) (145). Ωστόσο, πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον έλεγχο της ευαισθησίας των καρβαπενεμών θεωρείται το Etest, όπως και η μέθοδος διάχυσης των δίσκων που αναφέρθηκε νωρίτερα. Μάλιστα, με τις μεθόδους διάχυσης αναδεικνύεται αποτελεσματικά η ετερογενής αντοχή, δηλαδή η ανάπτυξη αποικιών εντός της άλω αναστολής της ανάπτυξης γύρω από τους δίσκους ή τις ταινίες των καρβαπενεμών, ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στο *A. baumannii*.

Κολιστίνη. Ο έλεγχος ευαισθησίας της κολιστίνης αποτελεί μία πρόκληση, λόγω των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων. Η μέθοδος DD θεωρείται αναξιόπιστη για την ανίχνευση της αντοχής στην κολιστίνη και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κολιστίνη είναι μεγάλο, αμφιπολικό μόριο και δεν διαχέεται καλά στο άγαρ, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρές ζώνες αναστολής της ανάπτυξης γύρω από τα δισκία (149–151). Επιπλέον, ούτε το CLSI, ούτε η EUCAST έχουν θεσπίσει όρια ευαισθησίας για τη μέθοδο DD έναντι του *Acinetobacter* spp. Έτσι λοιπόν, ο έλεγχος της ευαισθησίας στην κολιστίνη πρέπει να βασίζεται σε μία μέθοδο προσδιορισμού της MIC. Επί του παρόντος, οι διαθέσιμες μέθοδοι για τον σκοπό αυτό περιλαμβάνουν τη μέθοδο κλιμακωτής διάχυσης με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού, όπως το Etest, τα αυτοματοποιημένα συστήματα, τη μέθοδο AD και τη μέθοδο BMD. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν εγκεκριμένες μέθοδοι από τον οργανισμό U.S. FDA για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην κολιστίνη. Τα δισκία, το Etest και τα εμπορικά πάνελς BMD ενδείκνυνται μόνο για ερευνητική χρήση.

Μεταξύ των εμπορικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα του εργαστηρίου, οι ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού αποτελούν ταχεία μέθοδο προσδιορισμού των MICs στην κολιστίνη, αλλά η αξιοπιστία τους εμφανίζεται αμφιλεγόμενη στη βιβλιογραφία. Έτσι, ενώ μερικές μελέτες έδειξαν εξαιρετική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων του Etest και των μεθόδων BMD και AD, υποδηλώνοντας τη χρησιμότητά του για την ανίχνευση ανθεκτικών στην κολιστίνη Gram-αρνητικών βακτηρίων (151–153), άλλες αναφορές αμφισβητούν την αξιοπιστία του (154, 155). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι και το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή ευαισθησίας είναι σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την απόδοση των μεθόδων. Έτσι λοιπόν, η δραστηριότητα της κολιστίνης επηρεάζεται από την περιεκτικότητα των δισθενών κατιόντων (Ca^{++} , Mg^{++}) και άρα η μεταβλητότητα στη συγκέντρωση των κατιόντων στο Mueller-Hinton άγαρ (MHA) μεταξύ διαφορετικών εταιρειών και παρτίδων μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Μια άλλη εμπορική δοκιμασία κλιμακωτής διάχυσης, το MIC Test Strip (MTS, Liofilchem SRL, Italy), δεν έχει ακόμη αξιολογηθεί για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην κολιστίνη. Ακόμη, λίγες μόνο μελέτες έχουν αξιολογήσει μέχρι σήμερα τη χρήση των εμπορικών αυτοματοποιημένων μεθόδων. Οι μελέτες αυτές κυρίως εκτίμησαν την απόδοση του συστήματος Vitek 2, η οποία φάνηκε να είναι ικανοποιητική (151, 153, 155).

Οι πρότυπες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της MIC, η BMD και η AD (25, 26), δεν είναι εφικτό να εφαρμοστούν στα συνήθη κλινικά εργαστήρια λόγω της πολυπλοκότητάς

τους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τον έλεγχο της ευαισθησίας με τις μεθόδους αυτές πρέπει οπωσδήποτε να χρησιμοποιείται η θειϊκή κολιστίνη (colistin sulfate) κι όχι η νατριούχος κολιστιμεθάτη (colistimethate sodium), η οποία είναι μη δραστικό προφάρμακο της κολιστίνης για παρεντερική χρήση. Όσον αφορά στην BMD, τεχνικά θέματα όπως το είδος (σχήμα) των βοθρίων ή η επεξεργασία της επιφάνειας των βοθρίων της πλάκας μικροτιτλοδότησης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα της MIC στην κολιστίνη (156, 157). Ακόμη, η κατιονική φύση της κολιστίνης ευνοεί την προσκόλλησή της στην επιφάνεια διαφόρων υλικών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες της μεθόδου BMD, όπως το πολυστυρένιο, με αποτέλεσμα τη μείωση, σε άλλοτε άλλο βαθμό, της πραγματικής συγκεντρώσεως του αντιβιοτικού κατά τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμασιών (28). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι με την προσθήκη του επιφανειοδραστικού παράγοντα πολυσορβικό 80 (polysorbate 80, P80) στα πάνελ της μεθόδου BMD (BMD-P80) ελαχιστοποιούνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κολιστίνης και των τοιχωμάτων των βοθρίων της μικροπλάκας και κατ'επέκταση μειώνεται η προσκόλλησή της σε αυτά, οδηγώντας σε σημαντική ελάττωση των MICs. Όπως έχει παρατηρηθεί, ο παράγοντας P80 επηρεάζει κυρίως τα βακτήρια με σχετικά χαμηλές MICs (≤ 2 $\mu\text{g/ml}$) (154, 157–159). Παρόλα αυτά, το CLSI δεν συνιστά τη χρήση του P80 για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην κολιστίνη με τη μέθοδο BMD (140). Επιπλέον, σύμφωνα με πρόσφατες παρατηρήσεις, έχει προταθεί ότι ο παράγοντας P80 έχει συνεργιστική δράση με την κολιστίνη, ίσως επειδή ενισχύει την αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με τη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη (160). Ως εκ τούτου, μάλλον απαιτούνται περαιτέρω μελέτες αξιολόγησης της απόδοσης της μεθόδου BMD-P80 για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα Gram-αρνητικά βακτήρια (161), αν και γενικά τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν υποστηρίζουν την εισαγωγή του παράγοντα αυτού στην κλινική πράξη.

Ακόμη, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι περισσότερες μελέτες που μέχρι τώρα διερεύνησαν την ακρίβεια των μεθόδων ευαισθησίας στην κολιστίνη χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο ευαίσθητα στην κολιστίνη *Acinetobacter* spp., ενώ η απόδοση των μεθόδων έχει ελάχιστα αξιολογηθεί σε ανθεκτικά στελέχη.

Τιγεκυκλίνη. Λόγω της εξάπλωσης των πολυανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* η τιγεκυκλίνη είναι σημαντική για τη θεραπεία και την επιτήρηση των αντίστοιχων λοιμώξεων. Ως εκ τούτου, η δοκιμή ευαισθησίας της τιγεκυκλίνης ζητείται ολοένα και πιο συχνά από τα κλινικά εργαστήρια. Όμως, ο έλεγχος της ευαισθησίας στην τιγεκυκλίνη έναντι του *A. baumannii* παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα. Γενικά, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες για τις μεθόδους και η *in vitro* δραστικότητα της τιγεκυκλίνης μπορεί να ποικίλει

ανάλογα με τη μεθοδολογία της εξέτασης και το μέσο που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, το CLSI και η EUCAST δεν προτείνουν όρια ευαισθησίας για την τιγεκυκλίνη έναντι του *A. baumannii*. Ωστόσο, μέχρι στιγμής οι περισσότεροι από τους ερευνητές χρησιμοποιούν τα όρια ευαισθησίας που προτείνονται από τον FDA για τα *Enterobacteriaceae* (ευαίσθητα: MIC ≤ 2 mg/L, ανθεκτικά: MIC ≥ 8 mg/L) ή τα κριτήρια της EUCAST για τα *Enterobacteriaceae* (ευαίσθητα: MIC ≤ 1 mg/L, ανθεκτικά: MIC ≥ 2 mg/L).

Η μέθοδος DD θεωρείται αναξιόπιστη, καθώς υπάρχει σύγχυση στη βιβλιογραφία για τα όρια ευαισθησίας (162) και επιπλέον επηρεάζεται από τον τύπο του άγαρ και τη συγκέντρωσή του σε μαγγάνιο. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση μαγγανίου οδηγεί σε μικρότερες διαμέτρους ζώνης αναστολής (163, 164). Το Etest έχει αναφερθεί ότι αποδίδει αυξημένες MICs και ως εκ τούτου υψηλότερα ποσοστά αντοχής σε σχέση με τη μέθοδο BMD (165–169). Ομοίως, και στην περίπτωση του Etest έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση του μαγγανίου στο MHA προκαλεί αυξημένες MICs (168, 170). Έτσι λοιπόν, η χρήση MHA από διαφορετικούς κατασκευαστές ή ακόμη και διαφορετικών παρτίδων του ίδιου κατασκευαστή θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποκλίσεις μεταξύ των μεθόδων (170). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει εξαιρετική συμφωνία μεταξύ του Etest και της μεθόδου BMD (171).

Η χρήση του Vitek 2 για τον καθορισμό της ευαισθησίας στην τιγεκυκλίνη έναντι του *A. baumannii* παρουσιάζει επίσης προβλήματα, καθώς έχει αναφερθεί ότι υπερεκτιμά τις MICs κατά 1-2 αραιώσεις οδηγώντας σε μη αποδεκτά σφάλματα (167, 169, 171).

Όσον αφορά στη μέθοδο AD, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει συγκρίσιμα αποτελέσματα με τη μέθοδο BMD (172). Ωστόσο, σε μία άλλη μελέτη που σύγκρινε την AD με τη μέθοδο αναφοράς BMD σε μία συλλογή *Acinetobacter* spp. διαπιστώθηκε ότι και στη μέθοδο AD επεισέρχονται οι παράγοντες που αναφέρθηκαν νωρίτερα, δηλαδή τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το άγαρ και ενδεχομένως την περιεκτικότητά του σε μαγγάνιο (173). Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα παλιά θρεπτικά υλικά θεωρούνται υπεύθυνα για την αύξηση των MICs (174), επειδή η δραστηριότητα της τιγεκυκλίνης επηρεάζεται από την ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου στο μέσο. Έτσι λοιπόν, για τον έλεγχο ευαισθησίας με τις μεθόδους αναφοράς AD ή BMD προτείνεται η χρήση φρέσκων υλικών (<12 ωρών) προς αποφυγή της οξειδωσης-αδρανοποίησης της τιγεκυκλίνης. Εναλλακτικά, η μικροπλάκα με τις αραιώσεις της τιγεκυκλίνης μπορεί να διατηρηθεί αναλλοίωτη στην κατάψυξη αμέσως μετά την παρασκευή της (175).

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η τιγεκυκλίνη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται θεραπευτικά για στελέχη *A. baumannii* από αιμοκαλλιέργειες με MICs >0.5 mg/L, καθώς

εμφανίζει χαμηλή μέγιστη εφικτή στάθμη στο πλάσμα (0.62-0.72 mg/L). Για τον λόγο αυτόν η ερμηνεία των αποτελεσμάτων απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.

Μινοκυκλίνη. Η μινοκυκλίνη είναι ένα παλιό αντιβιοτικό, το οποίο διατίθεται από το στόμα και τον τελευταίο καιρό σε ενδοφλέβια μορφή στις ΗΠΑ. Πρόσφατα έχει πάρει έγκριση από τον FDA για τη χρήση της σε Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου του *Acinetobacter* spp. Όπως προκύπτει από μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες, η μινοκυκλίνη αποτελεί σήμερα ένα από τα λίγα αντιμικροβιακά που διατηρούν σημαντικού βαθμού δραστηριότητα έναντι του *A. baumannii* (176). Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια εισάγεται ολοένα και συχνότερα στα θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από το *A. baumannii*. Ωστόσο, τα δεδομένα για την απόδοση των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ευαισθησίας της μινοκυκλίνης είναι περιορισμένα. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, το Vitek 2 και κυρίως το Etest παρήγαγαν υψηλότερες MICs στη μινοκυκλίνη σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς BMD. Έτσι λοιπόν, στελέχη ανθεκτικά στη μινοκυκλίνη με τις εμπορικές μεθόδους θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με πρότυπη μέθοδο, όπως είναι η BMD (177).

6. Πληθυσμιακή δομή του *A. baumannii*

Η κλινική σημασία του *A. baumannii* έχει αυξηθεί δραματικά από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 με την εμφάνιση και την εξάπλωση των τριών κυρίαρχων διεθνών κλώνων IC1, IC2 και IC3, οι οποίοι προκαλούν νοσοκομειακές επιδημίες σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο σήμερα, περισσότεροι από 900 ST τύποι περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων MLST (σχήμα Pasteur) του *A. baumannii* (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). Σύμφωνα με μια πρόσφατη ανάλυση με τη βοήθεια του σχήματος MLST του Ινστιτούτου Pasteur, η πληθυσμιακή δομή του *A. baumannii* αποτελείται από τουλάχιστον εννέα διακριτούς κλώνους που εξαπλώνονται σε μεμονωμένα νοσοκομεία ή/και σε όλο τον κόσμο. Στην πραγματικότητα, ο διεθνής κλώνος IC1 και πιο πρόσφατα ο διεθνής κλώνος IC2 επικράτησαν παγκοσμίως και περιλαμβάνουν την πλειονότητα των στελεχών, τα οποία μάλιστα είναι πολυανθεκτικά. Οι διεθνής κλώνος IC3 και οι κλώνοι CC10, CC15, CC32, ST25 και ST52 έχουν απομονωθεί σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, ο κλώνος CC79 στη Βραζιλία και την Ισπανία, ενώ ο τύπος ST78 έχει ανιχνευθεί σε αρκετά Ιταλικά νοσοκομεία (101).

7. Λοιμογόνοι παράγοντες στο *A. baumannii*

Τα τελευταία χρόνια, η ανάλυση αρκετών αλληλουχιών του γονιδιώματος σε συνδυασμό με τις αναλύσεις σε μοντέλα πειραματικών λοιμώξεων έχουν βοηθήσει στον εντοπισμό σημαντικών λοιμογόνων παραγόντων για την παθογένεια του *A. baumannii*. Αυτοί περιλαμβάνουν τον σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm), την προσκόλληση και τη λειτουργία της εξωτερικής μεμβρανικής πρωτεΐνης, την κάψα, τον λιποπολυσακχαρίτη, τα σιδηροφόρα συστήματα και την “αίσθηση του χώρου ή της απαρτίας” (quorum-sensing) (12).

Ο σχηματισμός βιομεμβράνης είναι ένας από τους καλύτερα μελετημένους λοιμογόνους παράγοντες στο *A. baumannii* (178, 179). Η παραγωγή βιομεμβράνης μπορεί να εξηγήσει την επιτυχία του παθογόνου αυτού να προκαλεί νοσοκομειακές λοιμώξεις και την ικανότητά του να διατηρείται στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Ο Tomaras *et al.* έδειξαν ότι το οπερόνιο *csu* είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του συστήματος chaperone-usher pili assembly, το οποίο απαιτείται για τη συναρμολόγηση και έκκριση ινιδίων και τον σχηματισμό βιομεμβράνης σε αβιοτικές επιφάνειες (180). Εξίσου σημαντική για τον σχηματισμό βιομεμβράνης είναι η ρυθμιστική πρωτεΐνη απόκρισης (response regulator) BfmR, η έλλειψη της οποίας όπως έχει αποδειχθεί, επηρεάζει αρνητικά την έκφραση του οπερονίου *csu*. Από την άλλη πλευρά, το γονίδιο *bfmS* που κωδικογραφεί την ομόλογο κινάση-αισθητήρα (sensor kinase) του παρόντος ρυθμιστικού συστήματος δύο συστατικών (two-component regulatory system) παίζει λιγότερο σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό βιομεμβράνης (181). Επίσης, το γονίδιο *bap* που κωδικογραφεί για την προσκολλητίνη Bap (biofilm-associated protein) είναι σημαντικό για την παραγωγή και τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής της ώριμης βιομεμβράνης (182). Άλλα γονίδια που σχετίζονται με τον σχηματισμό και την ωρίμανση της βιομεμβράνης περιλαμβάνουν το οπερόνιο *pgaABCD*, το οποίο κωδικογραφεί για τη σύνθεση του εξωκυττάριου πολυσακχαρίτη poly-β-1,6-Nacetylglucosamine (PNAG) (183) και το γονίδιο *pglL* που κωδικογραφεί ένα σύστημα γλυκοζυλίωσης πρωτεΐνης (O-linked protein glycosylation system) (184). Ακόμη, το γονίδιο *abaI*, το οποίο κωδικογραφεί για μια συνθετάση αυτεπαγωγέα που ενέχεται στη διαμεσολάβηση της διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται “αίσθηση του χώρου ή της απαρτίας” (185) και το γονίδιο *ata*, το οποίο κωδικογραφεί μια επιφανειακή πρωτεΐνη προσκόλλησης (186). Επιπλέον, όπως έχει βρεθεί από τον Gabral *et al.*, αρκετές πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας (όπως CarO, OmpA, OprD-like, DcaP-like, PstS, LysM και Omp33), καθώς και

πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της ιστιδίνης συμμετέχουν στον σχηματισμό της βιομεμβράνης (187).

Όπως φαίνεται, μετά την προσκόλλησή του στα ανθρώπινα κύτταρα το *A. baumannii* μπορεί να επάγει την απόπτωση μέσω της πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης OmpA (188). Η OmpA συμβάλλει, επίσης, στην ανάπτυξη βιομεμβράνης σε πλαστικά υλικά (189) και την παραμονή και ανάπτυξη στον ανθρώπινο ορό, παράγοντες οι οποίοι βοηθούν στη διασπορά του *A. baumannii* κατά τη διάρκεια της λοίμωξης (190). Επίσης, το γονίδιο *pbpG*, το οποίο κωδικογραφεί την πενικιλινοδεσμευτική πρωτεΐνη 7/8 (191), το γονίδιο *pld* που κωδικογραφεί για τη φωσφολιπάση D (192), το γονίδιο *lpsB* που κωδικογραφεί για μια γλυκοζυλοτρανσφεράση που συμμετέχει στη σύνθεση του λιποπολυσακχαρίτη (193) και τα γονίδια *ptk* και *epsA* που απαιτούνται για τον πολυμερισμό και τη συναρμολόγηση της κάψας (194) συμβάλλουν, επίσης, στην ικανότητα του *A. baumannii* να αναπτύσσεται στον ανθρώπινο ορό.

Παρόλα αυτά, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος μεμονωμένος παράγοντας που θα μπορούσε να ευθύνεται για την επικράτηση των διεθνών κλώνων. Έτσι, ο λόγος για την επικράτηση των κλώνων IC1 και IC2 στις επιδημίες που προκαλούνται από στελέχη *A. baumannii* είναι ακόμα ασαφής. Ο κλώνος IC2 φαίνεται ότι είναι ευρύτερα διαδεδομένος από ό, τι ο IC1, αν και οι δύο κλώνοι εμφανίζουν παρόμοιο τρόπο εξάπλωσης και αποικισμού των ασθενών κατά τη διάρκεια των επιδημιών. Απ' ό,τι φαίνεται, κάθε κλώνος μπορεί να εκφράσει μια πληθώρα λοιμογόνων παραγόντων και σε διαφορετικούς συνδυασμούς (195, 196). Έτσι, αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα στελέχη που ανήκουν στον κλώνο IC1 παρουσιάζουν μεγαλύτερη κινητικότητα και μεγαλύτερη αντοχή στην αποξήρανση (195, 197) σε σχέση με στελέχη που ανήκουν στον κλώνο IC2 ή στελέχη που δεν ανήκουν σε κάποιο διεθνή κλώνο. Αντίθετα, στελέχη που ανήκουν στον κλώνο IC2 δείχνουν μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης και σχηματισμού βιομεμβράνης από στελέχη που ανήκουν στον κλώνο IC1 και στελέχη που δεν ανήκουν σε κάποιο διεθνή κλώνο (195, 197–199), καθώς και υψηλότερη πρωτεολυτική δραστηριότητα (195). Από την άλλη πλευρά, με βάση τη γονιδιωματική συγκριτική ανάλυση έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ανάδυση των διεθνών κλώνων είναι πιθανόν να μην συνδέεται άμεσα με την απόκτηση μεμονωμένων λοιμογόνων παραγόντων, αλλά είναι το αποτέλεσμα του πολυανθεκτικού φαινοτύπου αντοχής τους, ο οποίος τους προσφέρει το μεγαλύτερο επιλεκτικό πλεονέκτημα (4, 126, 200).

8. Μικροβιακή αντοχή του *A. baumannii* στα αντιβιοτικά

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαπενταετίας, τα MDR και τα εκτεταμένα ανθεκτικά (extensively drug-resistant, XDR) στελέχη *A. baumannii* διασπείρονται με εξαιρετική επιτυχία σε όλο τον κόσμο (201, 202). Οι όροι MDR, XDR και πανανθεκτικά (pandrug-resistant, PDR) *A. baumannii* χρησιμοποιούνται για να ορίσουν στελέχη που εμφανίζουν αντοχή σε τρεις ή περισσότερες κατηγορίες, σε όλες εκτός από μία ή δύο κατηγορίες και σε όλες τις κατηγορίες, αντίστοιχα, των δυνητικά αποτελεσματικών αντιμικροβιακών παραγόντων έναντι του *A. baumannii* (9, 202). Η αντοχή του *A. baumannii* στα αντιβιοτικά οφείλεται σε συνδυασμό μηχανισμών, που περιλαμβάνουν συνήθως την αδιαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, την αυξημένη έκφραση των αντλιών εκροής και την παραγωγή διαφόρων ενζύμων. Γενικά, ο κύριος λόγος που καθιστά το *A. baumannii* ένα τόσο επιτυχημένο παθογόνο τα τελευταία χρόνια είναι η αξιοσημείωτη ικανότητά του να αποκτά ταχύτατα μέσω μεταθετών στοιχείων (πλασμίδια, τρανσποζόνια, ιντεγκρόνια) ξένα γονίδια αντοχής από άλλα μικρόβια και να τα ενσωματώνει στο χρωμόσωμά του ως νησίδια αντοχής. Με τον τρόπο αυτόν εμφανίζει σπουδαία γενετική προσαρμοστικότητα στις πιέσεις επιλογής που δέχεται στο νοσοκομειακό περιβάλλον (3).

Από το 2000 κι έπειτα έχει παρατηρηθεί μια σταδιακή, παγκόσμια επικράτηση στελεχών που είναι ανθεκτικά σε όλες τις β-λακτάμες συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών, πιθανότατα ως συνέπεια της πίεσης επιλογής που προκαλείται από την έκθεση στελεχών *A. baumannii* σε ισχυρά αντιμικροβιακά, κυρίως στη ΜΕΘ (9). Επιδημίες που προκαλούνται από τέτοια στελέχη έχουν περιγραφεί και ταυτοποιηθεί σε αρκετές ΜΕΘ παγκοσμίως. Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις οι επιδημίες έχουν συνδεθεί με στελέχη που είναι ανθεκτικά σε όλους τους διαθέσιμους αντιμικροβιακούς παράγοντες, εκτός από την κολιστίνη ή την τιγκεκυκλίνη (203). Ωστόσο, αν και η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη είναι ακόμη δραστικές στη συντριπτική πλειοψηφία των κλινικών στελεχών *A. baumannii*, οι αναφορές σχετικά με την εμφάνιση αντοχής σε διάφορες περιοχές παγκοσμίως αποτελεί ανησυχητικό γεγονός που απασχολεί έντονα την επιστημονική κοινότητα.

8.1. Αντοχή στις καρβαπενέμες: Επιδημιολογία και μηχανισμοί

Το πρόγραμμα παγκόσμιας επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής SENTRY, που περιελάμβανε 2621 στελέχη *Acinetobacter* spp. που απομονώθηκαν στη Βόρεια Αμερική,

την Ευρώπη, τη Λατινική Αμερική και την περιοχή Ασίας-Ειρηνικού (APAC) το χρονικό διάστημα 2001-2004, κατέδειξε ότι συνολικά ποσοστό 81,1% και 77,7% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη, αντίστοιχα. Για την ιμιπενέμη το ποσοστό ευαισθησίας κυμάνθηκε μεταξύ 70,3% στην Ευρώπη και την περιοχή Ασίας-Ειρηνικού και 89,4% στη Βόρεια Αμερική, ενώ για τη μεροπενέμη το ποσοστό κυμάνθηκε μεταξύ 70,4% στην Ευρώπη και 83,7% στη Βόρεια Αμερική (204). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ίδιου προγράμματος παγκόσμιας επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής για το χρονικό διάστημα 2006-2009, μεταξύ 4686 στελεχών *Acinetobacter* spp. ποσοστό 55,7% ήταν συνολικά ευαίσθητα στην ιμιπενέμη, με το ποσοστό σταδιακά να μειώνεται από 65,8% το 2006 σε 40,2% το 2009. Αναλυτικότερα, στη Βόρεια Αμερική το ποσοστό ευαισθησίας κυμάνθηκε μεταξύ 77,8% το 2006 και 62,5% το 2009, ενώ στη Λατινική Αμερική μεταξύ 73% το 2006 και 48,3% το 2009. Πτωτική τάση σημειώθηκε, επίσης, για το ποσοστό ευαισθησίας στην Ευρώπη από 64,7% το 2006 σε 53% το 2009, ενώ στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού το ποσοστό ελαττώθηκε από 59,4% το 2006 σε 37,4% το 2009 (205). Μια μεταγενέστερη μελέτη SENTRY, η οποία περιελάμβανε 1377 στελέχη *Acinetobacter* spp. που απομονώθηκαν το 2011, κατέδειξε ότι συνολικά 412 στελέχη (ποσοστό 29,9%) ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη, με το ποσοστό να κυμαίνεται μεταξύ 48,8% στη Βόρεια Αμερική και 19,1% στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού (206). Από τις παραπάνω μελέτες επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής γίνεται σαφές ότι σε βάθος δεκαετίας (2001-2011) σημειώθηκε αξιοσημείωτη πτώση της ευαισθησίας στις καρβαπενέμες σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές παγκοσμίως.

Πρόσφατα δεδομένα από το πρόγραμμα παγκόσμιας επιτήρησης μικροβιακής αντοχής SMART που συμπεριέλαβε 2337 στελέχη *A. baumannii*, τα οποία συλλέχθηκαν κατά την περίοδο 2011-2014 από 48 χώρες σε έξι γεωγραφικές περιοχές (Αφρική, Ασία, Ευρώπη, Λατινική Αμερική, Μέση Ανατολή και Βόρεια Αμερική), κατέδειξαν στατιστικά σημαντική πτώση του ποσοστού ευαισθησίας στην ιμιπενέμη από 28,6% το 2011 σε 9,8% το 2014 στην Αφρική, από 21% το 2011 σε 8,6% το 2014 στην Ευρώπη και από 27,6% το 2011 σε 9,3% το 2014 στη Μέση Ανατολή. Χαμηλά ποσοστά ευαισθησίας στην ιμιπενέμη σημειώθηκαν, επίσης, στην Ασία και τη Λατινική Αμερική (26,9% και 16,3%, αντίστοιχα), χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική πτώση κατά τη διάρκεια των ετών 2011-2014. Το υψηλότερο ποσοστό ευαισθησίας στην ιμιπενέμη (63,8%) παρατηρήθηκε στη Βόρεια Αμερική, όπως και στις προηγούμενες παγκόσμιες μελέτες (207).

Κατά το χρονικό διάστημα 1997-2008 είχε παρατηρηθεί στην Ευρώπη σταδιακή αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών στελεχών στις καρβαπενέμες από τις βόρειες προς

τις νότιες χώρες (5). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι πρόσφατα το *A. baumannii* δεν παρακολουθούταν από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Μικροβιακής Αντοχής (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS-Net), οπότε η συλλογή πληροφοριών σχετικά με τον επιπολασμό της αντοχής στις καρβαπενέμες και σε άλλα αντιβιοτικά στις διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες ήταν σχετικά δύσκολη. Ωστόσο, μετά από πιλοτική περίοδο κατά τη διετία 2012-2013, το *Acinetobacter* spp. εντάχθηκε στο πρωτόκολλο του EARS-Net. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με τα δεδομένα της ετήσιας έκθεσης του EARS-Net το 2014 και το 2015, η αντοχή στις καρβαπενέμες μεταξύ των *Acinetobacter* spp. ήταν συχνή στην Ευρώπη και στις περισσότερες περιπτώσεις συνδυάστηκε με την αντοχή στις φθοριοκινολόνες και τις αμινογλυκοσίδες (6, 208). Μάλιστα, υψηλότερα ποσοστά αντοχής στις καρβαπενέμες, όπως και συνδυασμένης αντοχής, παρατηρήθηκαν κυρίως στις χώρες της Βαλτικής και της Νότιας και Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Αναλυτικότερα, τα ποσοστά των ανθεκτικών στελεχών στις καρβαπενέμες το 2014 κυμαίνονταν από μηδέν (Ολλανδία) έως 93,2% (Ελλάδα). Εκτός από τη χώρα μας, υψηλά ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν επίσης στην Ιταλία (89,9%), την Κροατία (87,3%), τη Ρουμανία (81,3%), τη Λετονία (78,8%), την Κύπρο (77,6%), τη Λιθουανία (69,7%), την Ισπανία (65,4%), τη Βουλγαρία (59,1%) και την Πορτογαλία 53,1%.

Αναφορικά με την εξέλιξη της αντοχής των *A. baumannii* στις καρβαπενέμες στην Ελλάδα, το 2000 άρχισαν να εμφανίζονται στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες (209). Από το 2002 και μεταγενέστερα τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη επικράτησαν σταδιακά στα Ελληνικά νοσοκομεία (210, 211). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του WHONET για τα στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες από όλες τις Ελληνικές ΜΕΘ, το ποσοστό των μη ευαίσθητων στελεχών στην ιμιπενέμη αυξήθηκε σταδιακά από 90,4 το 2007 σε >99% το 2014 και διατηρείται σε σταθερά επίπεδα έως το 2016. Αντίστοιχη τάση παρατηρήθηκε και για τη μεροπενέμη, για την οποία το ποσοστό των μη ευαίσθητων στελεχών το 2016 είναι επίσης >99%.

Η αντοχή του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες οφείλεται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς. Ο πιο σημαντικός μηχανισμός είναι η παραγωγή καρβαπενεμασών που περιλαμβάνει κυρίως τις οξακιλλινάσες τύπου σερίνης (μοριακής τάξης D κατά Ambler) και λιγότερο συχνά τις μέταλλο-β-λακταμάσες (metallo-β-lactamases, MBL) (212).

- Οξακιλλινάσες ή καρβαπενεμάσες τύπου-OXA

Η πρώτη αναφερόμενη οξακιλλινάση με δραστηριότητα καρβαπενεμάσης ήταν ένα πλασμιδιακό ένζυμο που απομονώθηκε το 1985 στη Σκωτία, το οποίο αρχικά ονομάστηκε

ARI-1 και αργότερα ονομάστηκε *bla*_{OXA-23} (213). Αυτή η οξακιλλινάση συμβάλλει επί του παρόντος στην αντοχή του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες στις περισσότερες χώρες σε όλο τον κόσμο (127, 214–217). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μια τάση σταδιακής αντικατάστασης των στελεχών *A. baumannii* που παράγουν OXA-23 οξακιλλινάση από στελέχη που παράγουν OXA-58 οξακιλλινάση, ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου (218, 219), γεγονός που δείχνει τη δυναμική εξάπλωσης των OXA-23 ενζύμων. Επίσης, στο *A. baumannii* έχουν βρεθεί κι άλλες καρβαπενεμάσες τύπου-OXA, παρόμοιες με την OXA-23, που σχηματίζουν με αυτήν κοινή ομάδα γονιδίων, την ομάδα OXA-23-like. Πρόκειται για την OXA-27 που έχει εντοπιστεί στη Σιγκαπούρη (220) και τις OXA-49 και OXA-73 που ανιχνεύθηκαν στην Κίνα (221, 222). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι τα επιδημικά στελέχη *A. baumannii* που παράγουν το ένζυμο OXA-23 ανήκουν στους διεθνείς κλώνους I ή II (223). Το γονίδιο *bla*_{OXA-23} βρίσκεται είτε στο χρωμόσωμα, είτε σε πλασμίδια και συνδέεται με τέσσερις διαφορετικές γενετικές δομές, εκ των οποίων πιο συχνό είναι το τρανσποζόνιο Tn2006 (223).

Άλλες ομάδες επίκτητων καρβαπενεμασών τύπου-OXA με ευρεία διασπορά είναι η ομάδα OXA-24/40-like (OXA-24, -25, -26, -40 και -72), (224, 225) και η ομάδα OXA-58-like (224, 226). Τα ένζυμα της ομάδας OXA-24/40-like έχουν 60% ομολογία αμινοξέων με τα ένζυμα της ομάδας OXA-23-like. Η πρώτη οξακιλλινάση που περιγράφηκε από την ομάδα αυτή, η OXA-24, η οποία αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι ταυτόσημη με την OXA-40, απομονώθηκε σε στέλεχος *A. baumannii* στην Ισπανία το 1997 (225). Η οξακιλλινάσες OXA-25 και OXA-26 απομονώθηκαν από στελέχη *A. baumannii* στην Ισπανία και το Βέλγιο, αντίστοιχα, στο χρονικό διάστημα μεταξύ 1995 και 1997 (220). Τέλος, τα ένζυμα OXA-72 εντοπίστηκαν αρχικά σε στελέχη *A. baumannii* στη Νοτιοανατολική Ασία (227–229), ενώ αργότερα απομονώθηκαν από στελέχη *A. baumannii* στην Κροατία (230), τη Βραζιλία (231) και την Ιταλία (232). Γενικά, τα ένζυμα OXA-24/40 ανιχνεύονται συχνότερα μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* από την Ιβηρική χερσόνησο και ανήκουν στον διεθνή κλώνο II και στον τύπο ST56 (σχήμα Oxford) (233–235). Στην Ιταλία έχει βρεθεί ότι στελέχη *A. baumannii* που παράγουν την OXA-72 οξακιλλινάση ανήκουν στον τύπο ST25, σύμφωνα με το σχήμα MLST του Ινστιτούτου Pasteur (232). Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια *bla*_{OXA-24} και *bla*_{OXA-72} έχουν βρεθεί σε πλασμίδια με παρόμοια γενετική δομή (232, 235, 236).

Τα γονίδια της ομάδας OXA-58-like (OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164) είναι συνήθως πλασμιδιακά (117, 237) και έχουν συνδεθεί με νοσοκομειακές επιδημίες σε διάφορες ΜΕΘ παγκοσμίως (211). Στη χώρα μας η OXA-58 αποτελούσε τη μοναδική

καρβαπενεμάση μεταξύ των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες *A. baumannii* που απομονώθηκαν από το 2000 έως το 2009 (104). Αν και τα ένζυμα αυτά εντοπίζονται κυρίως μεταξύ ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii*, κάποιες δημοσιεύσεις ανέφεραν την παρουσία τους και μεταξύ ευαίσθητων στις καρβαπενέμες στελεχών (210, 238, 239). Έχει παρατηρηθεί ότι επιδημικά στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν στην Ευρώπη και παράγουν την οξακυλινάση OXA-58 ανήκουν στους διεθνείς κλώνους I, II και III, αλλά επίσης και στους τύπους ST15, ST25 και ST78, σύμφωνα με το σχήμα MLST του Ινστιτούτου Pasteur (104, 240). Συνήθως τα γονίδια *bla*_{OXA-58-like} μεταφέρονται με πλασμίδια μέσω της οριζόντιας μεταφοράς (211, 237) και πλαισιώνονται από τις αλληλουχίες εισδοχής IS*Aba2* ή IS18 ή IS*Aba1* στο 5' άκρο και την αλληλουχία εισδοχής IS*Aba3* στο 3' άκρο τους (121, 241, 242).

Μια άλλη ομάδα OXA καρβαπενεμασών που έχει ανιχνευθεί σχετικά πρόσφατα στη Βραζιλία είναι η ομάδα OXA-143-like, η οποία περιλαμβάνει τα ένζυμα OXA-143 (243) και OXA-231 (244). Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα αμινοξύ και έχουν 88% ομολογία αμινοξέων με την ομάδα ενζύμων τύπου OXA-24/40, 63% ομοιότητα με την ομάδα τύπου OXA-23 και 52% ομοιότητα με την ομάδα ενζύμων τύπου OXA-58. Μέχρι τώρα έχουν εντοπιστεί μόνο σποραδικά μεταξύ στελεχών *A. baumannii* από τη Βραζιλία, όπου τα ένζυμα OXA-23 εξακολουθούν να επικρατούν. Και τα δύο γονίδια, *bla*_{OXA-143} και *bla*_{OXA-231}, ανευρίσκονται σε πλασμίδια (243, 244).

Πρόσφατα περιγράφηκε μια νέα ομάδα ενζύμων που ονομάζεται OXA-235-like (OXA-235, OXA-236 και OXA-237). Τα ένζυμα αυτά ανιχνεύτηκαν σποραδικά σε λίγα στελέχη στις ΗΠΑ. Έχουν ομολογία αμινοξέων 54% έως 57% με τα ένζυμα τύπου OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 και OXA-143 και 56% ομοιότητα με τα ένζυμα τύπου OXA-51 (245).

Τέλος, τα ένζυμα της ομάδας OXA-51-like (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80 και -82) διαφέρουν από τις άλλες καρβαπενεμάσες τύπου-OXA στο γεγονός ότι ανευρίσκονται ενδογενώς στο χρωμόσωμα όλων των *A. baumannii* (246). Όταν, όμως, τα ένζυμα αυτά συνδυαστούν με αλληλουχίες εισδοχής προκαλείται η υπερέκφρασή τους, με αποτέλεσμα να αποκτούν δραστικότητα καρβαπενεμάσης (247).

- Μεταλλο-β-λακταμάσες

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες ανιχνεύονται λιγότερο συχνά στο *A. baumannii* από τις καρβαπενεμάσες τύπου-OXA, αλλά εμφανίζουν 100-1000 φορές πιο ισχυρή υδρολυτική ικανότητα. Η εργαστηριακή ανίχνευσή τους στα MDR στελέχη *A. baumannii* είναι σε ορισμένες περιπτώσεις δύσκολη (248), γεγονός που σημαίνει ότι η συμβολή τους στην

αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να υποεκτιμάται. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες, περιλαμβανομένων των καρβαπενεμών, αλλά όχι την αζτρεονάμη. Στο *A. baumannii* έχουν ανευρεθεί τέσσερις τύποι ενζύμων MBL, που περιλαμβάνουν τα ένζυμα τύπου IMP (IMP-like), τύπου VIM (VIM-like), SIM-1 και NDM-1/NDM-2.

Τα ένζυμα τύπου IMP έχουν εντοπιστεί σε στελέχη *A. baumannii* σε αρκετές περιοχές, αλλά κυρίως απομονώθηκαν στην Άπω Ανατολή (3). Το πρώτο ένζυμο τύπου IMP, το IMP-2, ανιχνεύτηκε το 2000 στην Ιταλία (249). Στη συνέχεια ακολούθησε η ανίχνευση του ενζύμου IMP-4 στο Χονγκ Κονγκ (250) και στη Σιγκαπούρη (239), του IMP-5 στην Πορτογαλία (251, 252), του IMP-6 στη Βραζιλία (253), του IMP-8 στην Κίνα (227) και των IMP-11 και IMP-19 στην Ιαπωνία (254). Αξίζει να σημειωθεί ότι το IMP-1, το οποίο είναι το πρώτο και το πιο ευρέως διαδεδομένο ένζυμο τύπου IMP, περιγράφηκε για πρώτη φορά στο *A. baumannii* μόνο το 2008 και σε μια άλλη περίπτωση το 2011 (255, 256).

Όσον αφορά στα ένζυμα τύπου VIM, υπάρχουν λίγες μόνο και σποραδικές δημοσιεύσεις στη βιβλιογραφία που αναφέρονται στην ανίχνευσή τους στο *A. baumannii*. Η πρώτη αναφορά αφορούσε στο ένζυμο VIM-2, το οποίο εντοπίστηκε στη Βόρεια Κορέα το 2002 (257). Στη συνέχεια, τα ένζυμα VIM-1, VIM-3, VIM-4 και VIM-11 περιγράφηκαν σε σποραδικές περιπτώσεις στελεχών *A. baumannii* στην Ευρώπη και την Άπω Ανατολή (236, 258–260). Έχει βρεθεί ότι τα γονίδια *bla_{VIM-1}* και *bla_{VIM-4}* ανευρίσκονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1 (258, 260). Στην Ελλάδα έχουν περιγραφεί στελέχη *A. baumannii* που παρήγαγαν τις καρβαπενεμάσες VIM-1 και VIM-4 και ανήκαν στους διεθνείς κλώνους II και I, αντίστοιχα (240). Όσον αφορά στην καρβαπενεμάση SIM-1, η ανίχνευσή της έχει αναφερθεί μόνο μία φορά σε στελέχη *A. baumannii* στη Νότια Κορέα (261).

Τέλος, η πιο πρόσφατα περιγραφόμενη MBL, η NDM-1, εντοπίστηκε το 2010 σε ένα στέλεχος *A. baumannii* στην Ινδία (262), ενώ έχει βρεθεί επίσης στη Γερμανία, την Αλγερία, το Βέλγιο, το Μπαγκλαντές, την Κίνα και την Τσεχία (263–267). Γενικά, όπως εκτιμάται η NDM-1 εμφανίζει υψηλό επιπολασμό στην Ινδική Χερσόνησο, τη Βόρεια Αφρική και τη Μέση Ανατολή, ενώ θεωρείται αναδυόμενος μηχανισμός αντοχής και στην Ευρώπη. Πρόσφατα μάλιστα, η NDM-1 ανευρέθηκε για πρώτη φορά και στη χώρα μας σε ένα στέλεχος *A. baumannii* που απομονώθηκε από ασθενή που μεταφέρθηκε στην Ελλάδα από τη Λιβύη το 2016 (268). Επιπλέον, μία άλλη καρβαπενεμάση τύπου NDM, η NDM-2, έχει βρεθεί σε στελέχη *A. baumannii* στην Αίγυπτο (269) και τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (270). Επίσης, η κλωνική διασπορά ενός στελέχους *A. baumannii* που παρήγαγε NDM-2 έχει αναφερθεί σε κέντρο αποκατάστασης στο Ισραήλ (271). Έχει παρατηρηθεί ότι στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν στην Ευρώπη και παράγουν το ένζυμο NDM-1 ανήκουν

στους διεθνείς κλώνους I και II και στους MLST τύπους ST25 και ST85, σύμφωνα με το σχήμα Pasteur (263, 264). Αντίθετα, στελέχη *A. baumannii* που παράγουν το ένζυμο NDM-2 ανήκουν σε ένα ξεχωριστό κλώνο, τον τύπο ST253 (σχήμα Oxford) ή αλλιώς ST103 (σχήμα Pasteur) (269–271). Όπως έχει βρεθεί, τα γονίδια *bla*_{NDM-1} και *bla*_{NDM-2} στα στελέχη *A. baumannii* από την Ευρώπη είναι χρωμοσωμικά και ανευρίσκονται στο τρανσποζόνιο Tn125-like (264, 270, 271), ενώ το γονίδιο *bla*_{NDM-1} στα στελέχη από την Κίνα είναι πλασμιδιακό και μεταβιβάσιμο με σύζευξη (267).

Όλα τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν ότι οι κυρίαρχοι κλώνοι στο *A. baumannii*, όπως οι διεθνείς κλώνοι I και II και κάποιοι άλλοι επιδημικοί κλώνοι, επιλέχθηκαν λόγω της αντοχής στις καρβαπενέμες, η οποία οφείλεται στην απόκτηση των γονιδίων *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{VIM-like} ή *bla*_{NDM-1}.

- Άλλες καρβαπενεμάσες

Άλλες καρβαπενεμάσες που έχουν περιγραφεί στο *A. baumannii* περιλαμβάνουν τις β-λακταμάσες μοριακής τάξης A κατά Ambler, οι οποίες όμως είναι σπάνιες. Έτσι λοιπόν, τα ένζυμα τύπου KPC (KPC-2, -3, -4 και -10) ανιχνεύθηκαν στο 3,4% των MDR στελεχών *A. baumannii* που συλλέχθηκαν το 2009 σε 17 νοσοκομεία στο Πουέρτο Ρίκο (272). Επίσης, η ESBL GES-14, η οποία διαφέρει από τη GES-1 κατά δύο αμινοξέα εντοπίστηκε σε ένα κλινικό στέλεχος *A. baumannii* στη Γαλλία και συνδέθηκε με ανθεκτικότητα σε όλες τις β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών. Όπως έχει βρεθεί, το γονίδιο *bla*_{GES-14} εδράζεται σε ιντεγκρόνιο τάξης 1 ενός μεταβιβάσιμου πλασμιδίου (273).

- Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Εκτός από την παραγωγή των καρβαπενεμασών, η αντοχή στις καρβαπενέμες σε στελέχη *A. baumannii* συχνά οφείλεται σε μη ενζυμικούς μηχανισμούς, όπως οι μεταβολές/μειωμένη έκφραση στις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) (274), οι αντλίες εκροής (efflux pumps) πολλαπλών φαρμάκων (275) και οι τροποποιήσεις στις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (274). Συγκριτικά με άλλα Gram-αρνητικά παθογόνα, οι γνώσεις μας σχετικά με τις πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης στο *A. baumannii* είναι περιορισμένες. Έχει αναφερθεί ότι η απώλεια μιας πρωτεΐνης 29-kDa, η οποία είναι επίσης γνωστή ως CarO, συνδέεται με την αντοχή στις καρβαπενέμες (275). Οι αντλίες εκροής στο *A. baumannii*, εκ των οποίων η πιο μελετημένη είναι η αντλία AdeABC, εξωθούν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, όπως οι αμινογλυκοσίδες, η ερυθρομυκίνη, η χλωραμφαινικόλη, οι τετρακυκλίνες, οι φθοριοκινολόνες και η τριμεθοπρίμη, αλλά επηρεάζουν τις καρβαπενέμες

σε μικρότερο βαθμό (276). Ακόμη, ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του *A. baumannii* που μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση της αντοχής στις καρβαπενέμες είναι η πρόσφατα περιγραφόμενη ετεροαντοχή (heteroresistance), η οποία κατά πάσα πιθανότητα εμποδίζει την αποτελεσματική θανάτωση των μικροβίων και μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή των ανθεκτικών πληθυσμών (277).

8.2. Αντοχή στην κολιστίνη: Επιδημιολογία και μηχανισμοί

Καθώς τα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* αυξάνονται παγκοσμίως, οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων είναι περιορισμένες, με την κολιστίνη συχνά να αποτελεί τη μοναδική θεραπεία (7). Η κολιστίνη είναι κυκλικό πολυπεπτίδιο με ταχεία βακτηριοκτόνο δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, την οποία επιτυγχάνει μέσω σύνδεσης με το λιπίδιο A του λιποπολυσακχαρίτη και πρόκλησης αποδιοργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης (278).

Στην κλινική πράξη, η κολιστίνη χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία των λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii*, όπου καμία άλλη αξιόπιστη θεραπευτική επιλογή δεν είναι διαθέσιμη. Σε γενικές γραμμές, η κολιστίνη έχει εξαιρετική *in vitro* δραστηριότητα έναντι του *A. baumannii* και συνήθως τα περισσότερα στελέχη είναι ευαίσθητα. Ωστόσο, υπάρχουν αποκλίσεις στα ποσοστά ευαισθησίας ανάλογα με την περιοχή και για τον λόγο αυτόν οι κλινικοί γιατροί θα πρέπει να γνωρίζουν την επιδημιολογία των ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών σε τοπικό επίπεδο. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι ο προσδιορισμός της MIC στην κολιστίνη με τις συμβατικές μεθόδους παρουσιάζει, όπως προαναφέρθηκε, πολλά προβλήματα (279), με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, αλλά και η σύγκριση των ποσοστών αντοχής μεταξύ διαφορετικών μελετών. Επίσης, τα τρέχοντα όρια ευαισθησίας μπορεί να μην είναι ιδανικά από την άποψη της φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής. Λόγω αυτών των ζητημάτων το CLSI και η EUCAST έχουν συστήσει πρόσφατα μια κοινή ομάδα εργασίας, η οποία έχει σκοπό να εξετάσει τις μεθόδους ευαισθησίας που βασίζονται στον προσδιορισμό της MIC και τα όρια ευαισθησίας στις πολυμυξίνες, βασιζόμενη σε στοιχεία από πρόσφατες προκλινικές και κλινικές φαρμακοκινητικές/φαρμακοδυναμικές μελέτες.

Μετά την απομόνωση του πρώτου ανθεκτικού στην κολιστίνη στελέχους *Acinetobacter* spp. το 1999 στην Τσεχία (280) παρατηρήθηκε αύξηση των δημοσιεύσεων που ανέφεραν αντοχή στην κολιστίνη σε διάφορες περιοχές σε όλο τον κόσμο (7), η οποία

εμφανίζεται συχνότερα μεταξύ ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρά την παγκόσμια εξάπλωση της αντοχής στις καρβαπενέμες στο *A. baumannii* και την ολοένα και συχνότερη χρήση της κολιστίνης ως τελευταία θεραπευτική επιλογή δεν έχει αναφερθεί ευρεία διασπορά ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών. Σύμφωνα με τα δεδομένα της ετήσιας έκθεσης επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής στην Ευρώπη για το 2014 (EARS-Net), μεταξύ 2238 στελεχών *Acinetobacter* spp. που συλλέχθηκαν από 20 Ευρωπαϊκές χώρες η συνολική αντοχή στις πολυμυξίνες ήταν 4%, εκ των οποίων ποσοστό 80,1 % προήλθε από την Ελλάδα και την Ιταλία (281). Επίσης, σύμφωνα με τα δεδομένα της πολυκεντρικής μελέτης επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής SENTRY, η οποία περιέλαβε στελέχη από τις Ηνωμένες Πολιτείες, την Ευρώπη, τη Λατινική Αμερική και την περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού, η αντοχή στην κολιστίνη από το 2006 έως το 2011 κυμάνθηκε μεταξύ 0,9% και 2,1% (176, 205, 206). Ακόμη, μία πρόσφατη παγκόσμια μελέτη που συμπεριέλαβε 1312 στελέχη *A. baumannii* complex, τα οποία απομονώθηκαν το 2013, ανέφερε συνολικό ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη 96,4%, ενώ τα επιμέρους ποσοστά ήταν 96,3%, 94,1%, 97,9% και 98,1% για τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, την Ευρώπη/Μεσογειακές χώρες, τη Λατινική Αμερική και την περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού, αντίστοιχα. Ακόμη υψηλότερα εμφανίστηκαν τα ποσοστά αντοχής μεταξύ των XDR στελεχών στις Ηνωμένες Πολιτείες (94,5%) και την Ευρώπη (92,6%), ενώ για τη Λατινική Αμερική και την περιοχή της Ασίας-Ειρηνικού δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές (282).

Παρά το γεγονός ότι ορισμένες μεμονωμένες αναφορές εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά αντοχής σπάνια τα ποσοστά υπερβαίνουν το 5% (7), ενώ όταν αυτό συμβαίνει συνήθως υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί. Πολλές μελέτες που αναφέρουν υψηλά ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη περιλαμβάνουν στελέχη που είναι ευαίσθητα στις καρβαπενέμες ή/και δεν συμπεριλαμβάνουν όλα τα στελέχη *Acinetobacter* που απομονώνονται στο εκάστοτε νοσηλευτικό ίδρυμα. Για παράδειγμα, μια συχνά αναφερόμενη δημοσίευση που κατέγραψε αντοχή στην κολιστίνη 16,7%, έχει τον περιορισμό ότι περιέλαβε μόνο 18 στελέχη, εκ των οποίων τα 3 ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών (17/18) ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες (283). Ομοίως, ο Ko *et al.* (284) ανέφεραν το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη 31% σε 214 στελέχη *A. baumannii* από την Κορέα, ενώ το ποσοστό αντοχής στην ιμιπενέμη ήταν 8,3%. Όπως

ανέφεραν οι συγγραφείς, από τα 83 στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη μόνο 5 ήταν ανθεκτικά στην ιμιπενέμη. Παρά το γεγονός ότι ο Arroyo *et al.* (152) ανέφεραν ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη 19,1% στην Ισπανία (21/115 στελέχη), δεν είναι σαφές πώς επελέγησαν αυτά τα στελέχη και κατά πόσον ή όχι αυτά αντιστοιχούσαν στο σύνολο των στελεχών που απομονώθηκαν στο νοσοκομείο τους. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη χώρα μας, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη δραστικότητα της κολιστίνης σε στελέχη *A. baumannii*, καθώς το συγκεκριμένο αντιβιοτικό δεν παρακολουθείται από το εθνικό δίκτυο μελέτης της μικροβιακής αντοχής.

Αν και η κολιστίνη είναι ακόμα δραστική στη συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών *A. baumannii*, η εμφάνιση αντοχής και ετεροαντοχής σε κλινικά στελέχη σε διάφορες περιοχές σε όλο τον κόσμο προκαλεί σημαντική κλινική ανησυχία (7). Δεδομένης της αυξανόμενης επικράτησης των πανανθεκτικών στελεχών τονίζεται η ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αντοχής στην κολιστίνη στο *A. baumannii*.

Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντοχή της κολιστίνης δεν είναι ακόμα απολύτως γνωστοί. Έχουν προταθεί από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες δύο ανεξάρτητοι μεταξύ τους μηχανισμοί. Ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός είναι οι μεταλλάξεις και η υπερέκφραση των πρωτεϊνών του ρυθμιστικού συστήματος PmrAB, οι οποίες οδηγούν σε τροποποιήσεις του λιποπολυσακχαρίτη μέσω της προσθήκης φωσφοαιθανολαμίνης στο λιπίδιο A (285). Επίσης, παρατηρήσεις σε ανθεκτικά στην κολιστίνη κλινικά στελέχη *A. baumannii* έδειξαν ότι η τροποποίηση του λιποπολυσακχαρίτη με γαλακτοζαμίνη μπορεί να συμβάλλει στην αντοχή, αν και το ακριβές ρυθμιστικό μονοπάτι δεν είναι ακόμη γνωστό (286). Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η πλήρης απώλεια της παραγωγής του λιποπολυσακχαρίτη, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων (αντικατάσταση, έλλειψη ή αδρανοποίηση μέσω εισδοχής της αλληλουχίας IS*Aba11*) στα γονίδια *lpxA*, *lpxC* και *lpxD*, τα οποία σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του λιπιδίου A (287, 288).

Η ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη έχει συσχετιστεί με την πίεση επιλογής που ασκείται λόγω της παρατεταμένης χορήγησης του αντιβιοτικού (289, 290). Επί του παρόντος, υπάρχουν λίγες αναφορές αξιολόγησης των παραγόντων κινδύνου για την απομόνωση των ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών *A. baumannii*. Γενικά όμως, η έκθεση στην κολιστίνη αναγνωρίζεται ως ο συχνότερος παράγοντας κινδύνου για την επιλογή των ανθεκτικών στελεχών. Ο Qureshi *et al.* περιέγραψαν τα χαρακτηριστικά 20 ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *A. baumannii* σε ένα νοσοκομείο των ΗΠΑ, κατά τη διάρκεια 7 ετών. Όπως ανέφεραν οι συγγραφείς, στους 19 (95%) από τους 20

ασθενείς ανευρέθηκαν πριν από την απομόνωση των ανθεκτικών στελεχών γενετικά συσχετιζόμενα ευαίσθητα στην κολιστίνη *A. baumannii*, ενώ στο μεσοδιάστημα των απομονώσεων μεταξύ των ευαίσθητων και των ανθεκτικών στελεχών οι ασθενείς είχαν εκτεθεί σε ενδοφλέβια και/ή εισπνεόμενη μορφή κολιστίνης (291).

Η αντοχή στην κολιστίνη, επίσης, μπορεί να αναπτυχθεί από βακτήρια ετεροανθεκτικά στο αντιβιοτικό αυτό. Ως ετεροαντοχή ορίζεται η εμφάνιση της αντοχής σε ένα υποπληθυσμό βακτηριακών κυττάρων, ο οποίος μπορεί να επιβιώσει σε συγκέντρωση κολιστίνης μεγαλύτερη από 2 mg/L και αποτελεί μέρος ενός κατά τα άλλα ευαίσθητου πληθυσμού ($MIC \leq 2$ mg/L). Έχει θεωρηθεί ότι η μονοθεραπεία με κολιστίνη, καθώς και η χορήγησή της για μεγάλα χρονικά διαστήματα ή η χορήγηση υποθεραπευτικών δόσεων ενδεχομένως ευνοούν την επιλογή και πολλαπλασιασμό ενός ανθεκτικού υποπληθυσμού και οδηγούν στην ανάπτυξη της αντοχής στην κολιστίνη (292–294). Γενικά, η ετεροαντοχή στην κολιστίνη είναι αρκετά συχνή στα πολυανθεκτικά *A. baumannii* (7, 292). Δυστυχώς, η κατάλληλη μεθοδολογία για την αποκάλυψη των ετεροανθεκτικών υποπληθυσμών είναι η πληθυσμιακή ανάλυση, η οποία είναι χρονοβόρα και ως εκ τούτου δεν επιτρέπεται η εφαρμογή της σε μικροβιολογικά εργαστήρια ρουτίνας.

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η αντοχή στην κολιστίνη μπορεί να επηρεάσει την αντοχή σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών (295, 296). Σε μια μελέτη, η οποία συνέκρινε τα αντιβιογράμματα ευαίσθητων στην κολιστίνη κλινικών στελεχών *A. baumannii* με εκείνα των αντίστοιχων ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών που παρήχθησαν *in vitro*, παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη ήταν πιο ευαίσθητα σε άλλα αντιβιοτικά συγκριτικά με τα προγονικά τους ευαίσθητα στην κολιστίνη στελέχη (295). Ωστόσο, η κλινική σημασία αυτού του ευρήματος χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς στην κλινική πράξη τα περισσότερα ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη είναι συνήθως ανθεκτικά σε ένα ευρύ φάσμα άλλων αντιβιοτικών.

Η ανάπτυξη της αντοχής στην κολιστίνη μπορεί να επιφέρει βιολογικό κόστος και να επηρεάζει τη λοιμογόνο δύναμη στα στελέχη *A. baumannii*. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ότι οι αλλαγές στο σύστημα PmrAB σε κλινικά ή εργαστηριακά, ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της φυσικής κατάστασης και της μολυσματικότητας, όπως αντανακλάται από τη μειωμένη βακτηριακή ανάπτυξη και τη θνησιμότητα σε πειραματικά μοντέλα (290, 297–299). Η μειωμένη μολυσματικότητα των ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών υποστηρίχθηκε, επίσης, από κλινικές παρατηρήσεις (289). Ακόμη, μία μελέτη πρωτεωμικής ανάλυσης έδειξε ότι τα ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *A. baumannii* με μειωμένη λοιμογόνο δύναμη, τα οποία επιλέγησαν *in vitro* από

ευαίσθητα στην κολιστίνη στελέχη, εμφάνισαν διαφορετική έκφραση σε 35 πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές, οι περισσότερες από τις οποίες υποεκφράστηκαν στα ανθεκτικά στελέχη, περιελάμβαναν πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, συνοδούς πρωτεΐνες (chaperones), μεταφραστικούς παράγοντες και ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό (300).

8.3. Αντοχή στην τιγκεκυκλίνη: Επιδημιολογία και μηχανισμοί

Η τιγκεκυκλίνη είναι ημισυνθετικό παράγωγο της μινοκυκλίνης και ασκεί τη δράση της αναστέλλοντας την 30S υπομονάδα του ριβοσώματος. Έχει εγκριθεί από τον FDA για επιπλεγμένες λοιμώξεις του δέρματος και μαλακών μορίων, επιπλεγμένες ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και την εξωνοσοκομειακή βακτηριακή πνευμονία (301). Ωστόσο, η τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιείται εκτός των εγκεκριμένων ενδείξεων ως θεραπεία τελευταίας εκλογής για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που οφείλονται κυρίως σε MDR Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου του *A. baumannii*.

Διάφορες μελέτες από όλο τον κόσμο σχετικά με την *in vitro* δράση της τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *Acinetobacter* spp. αναφέρουν ένα ευρύ φάσμα των ποσοστών αντοχής που κυμαίνεται από 0% έως 81% (301). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως είναι το έτος συλλογής και το μικρό μέγεθος του δείγματος των στελεχών, η πιθανή κλωνική συγγένεια μεταξύ των στελεχών ή η συμπερίληψη σε ορισμένες μελέτες μόνο MDR στελεχών *A. baumannii*, τα οποία τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά αντοχής. Επιπλέον, τα προβλήματα στις μεθόδους ελέγχου ευαισθησίας που αναφέρθηκαν νωρίτερα και τα ερμηνευτικά κριτήρια που η κάθε μελέτη υιοθετεί φαίνεται ότι παίζουν ρόλο και δυσχεραίνουν τη συγκριτική αξιολόγηση των ποσοστών αντοχής.

Σε γενικές γραμμές, όπως προκύπτει από παγκόσμιες μελέτες επιτήρησης η τιγκεκυκλίνη εμφανίζει συνολικά καλή δραστηριότητα έναντι των στελεχών *A. baumannii* και συμβάλει στην επιτυχή θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων στην κλινική πράξη (302–304). Οι μελέτες αυτές χρησιμοποιούν για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη τη μέθοδο BMD, που θεωρείται επί του παρόντος η μέθοδος αναφοράς. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη αξιολόγησης και επιτήρησης της τιγκεκυκλίνης (TEST) που συμπεριέλαβε 6743 MDR στελέχη *A. baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν από όλο τον κόσμο κατά την περίοδο 2004-2013, η τιγκεκυκλίνη εμφάνισε MIC₉₀ 2 µg/ml (303). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από μία άλλη παγκόσμια μελέτη TEST, η οποία συμπεριέλαβε 10.149 στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν το διάστημα 2004-2009: η MIC₅₀ και η MIC₉₀ στην τιγκεκυκλίνη ήταν 0.5 και 2 µg/ml, αντίστοιχα. Επίσης, παρόλο που παρατηρήθηκε

αύξηση στον γεωμετρικό μέσο όρο της MIC στην τιγκεκυκλίνη από το 2004 έως το 2009, αυτή ήταν πολύ μικρή (0.3 έναντι 0.5, αντίστοιχα) (304). Στη χώρα μας, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη δραστηριότητα της τιγκεκυκλίνης σε στελέχη *A. baumannii*. Σύμφωνα με μία μελέτη, η οποία έλεγξε 56 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii* που απομονώθηκαν από πέντε νοσοκομεία κατά το διάστημα 2008-2011, η MIC₅₀ και η MIC₉₀ στην τιγκεκυκλίνη ήταν 2 και 4 µg/ml, αντίστοιχα (171).

Αν και οι μηχανισμοί αντοχής στην τιγκεκυκλίνη δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως, φαίνεται ότι οι αντλίες εκροής διαδραματίζουν τον σπουδαιότερο ρόλο. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αντοχή οφείλεται στην υπερέκφραση της αντλία εκροής πολλαπλών φαρμάκων AdeABC (305). Μία άλλη αντλία εκροής που θεωρείται ενδογενής στο *A. baumannii*, η αντλία AdeIJK, έχει επίσης αναφερθεί ότι επιδρά στην αποτελεσματικότητα της τιγκεκυκλίνης, ενεργώντας συνεργιστικά με την αντλία AdeABC (306). Παρά το γεγονός ότι σύμφωνα με παρατηρήσεις η τιγκεκυκλίνη είναι, επίσης, υπόστρωμα της αντλίας εκροής AdeFGH (307), τελικά φαίνεται ότι μόνο οι αντλίες AdeABC και AdeIJK εμπλέκονται στην αντοχή σε κλινικά στελέχη *A. baumannii* (307–309). Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο *trm*, το οποίο κωδικογραφεί μία μεθυλτρανσφεράση, συνδέθηκε με μειωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη σε ένα στέλεχος *A. baumannii*. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο πιθανός ρόλος αυτής της μεθυλτρανσφεράσης στη μειωμένη ευαισθησία της τιγκεκυκλίνης (310).

Τα επίπεδα αντοχής της τιγκεκυκλίνης έναντι των στελεχών *A. baumannii* μπορεί να αυξηθούν κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τιγκεκυκλίνη, ακόμη και σε περίπτωση σύντομης έκθεσης στο φάρμακο, θέτοντας σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητά της (301, 311). Όμως, ανθεκτικά στελέχη έχουν απομονωθεί και από ασθενείς χωρίς προηγούμενη χορήγηση τιγκεκυκλίνης, ίσως εν μέρει λόγω της υπερέκφρασης της αντλίας AdeABC που προκαλείται από άλλα αντιβιοτικά, τα οποία είναι επίσης υποστρώματα για την ίδια αντλία. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι αντοχή στην τιγκεκυκλίνη έναντι MDR στελεχών *A. baumannii* έχει αναφερθεί ακόμη και πριν από τη διάθεση του φαρμάκου για εμπορική χρήση (301).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών *A. baumannii* στα Ελληνικά νοσοκομεία είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Τα στελέχη αυτά αποτελούν σήμερα το συχνότερο παθογόνο στη ΜΕΘ. Επίσης, η αντοχή στην κολιστίνη μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* είναι δυστυχώς ένα ολοένα και περισσότερο παρατηρούμενο φαινόμενο, όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες.

Η αξιόπιστη ανίχνευση της αντοχής στα κλινικά εργαστήρια είναι εξαιρετικά σημαντική για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των αντίστοιχων λοιμώξεων και ειδικά όταν τα στελέχη *A. baumannii* είναι ευαίσθητα σε ελάχιστα ή κανένα άλλο αντιβιοτικό, οπότε είναι απαραίτητη η χορήγηση κολιστίνης. Την περίοδο έναρξης της παρούσας διατριβής, λίγες μελέτες είχαν αξιολογήσει την απόδοση των μεθόδων ευαισθησίας στην κολιστίνη, εμφανίζοντας αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, ενώ η βέλτιστη μέθοδος ήταν ακόμη υπό διερεύνηση.

Η ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη προκαλεί έντονη κλινική ανησυχία και καθιστά απαραίτητη τη βαθύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών και των παθογενετικών χαρακτηριστικών των ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών.

Επιπλέον, η αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων και της αντοχής των *A. baumannii* στα αντιβιοτικά καθιστά σημαντική την επιτήρηση της εξέλιξής τους, σε τοπικό αλλά, ακόμη περισσότερο, σε εθνικό επίπεδο. Παράδειγμα της εξέλιξης αυτής σε διεθνές επίπεδο αποτελεί ότι τα τελευταία χρόνια μελέτες σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες είχαν δείξει ότι οι OXA-23 τείνουν να αντικαταστήσουν σταδιακά τις OXA-58 καρβαπενεμάσες μεταξύ των *A. baumannii*. Σε προηγούμενη εθνική μελέτη στην Ελλάδα, η OXA-58 βρέθηκε ότι ήταν η μοναδική καρβαπενεμάση μεταξύ των CRAB στελεχών που απομονώθηκαν από το 2000 έως το 2009. Επίσης, η αντοχή στις καρβαπενέμες βαίνει αυξανόμενη τόσο στην Ελλάδα όσο και διεθνώς, όπως και η αντοχή στην κολιστίνη, οπότε είναι ιδιαίτερα σημαντική η ενδελεχής παρακολούθηση των εξελίξεων αυτών στη χώρα μας. Η τιγεκυκλίνη είναι, επίσης, ένα από τα λίγα αντιβιοτικά που παραμένει δραστικό έναντι των *A. baumannii* στην Ελλάδα, οπότε η διερεύνηση της δραστικότητάς της σε εθνικό επίπεδο κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

Με βάση τα παραπάνω, ο σκοπός των πειραμάτων που εκτελέστηκαν σε αυτή τη μελέτη διδακτορικής διατριβής ήταν:

1. Να διερευνηθεί η απόδοση εμπορικών μεθόδων προσδιορισμού της ευαισθησίας στην κολιστίνη που χρησιμοποιούνται στα μικροβιολογικά εργαστήρια σε σύγκριση με τις

πρότυπες μεθόδους, ειδικά σε στελέχη με υψηλές τιμές MIC.

2. Να διερευνηθούν οι φαινοτυπικές, γενωμικές και παθογενετικές μεταβολές που σχετίζονται με την ανάπτυξη της αντοχής στην κολιστίνη. Η μελέτη αυτή εκτελέστηκε σε οκτώ ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη που προήλθαν από τρεις γεωγραφικές περιοχές. Επίσης, διερευνήθηκαν σε βάθος δύο ζεύγη κολιστίνη-ευαίσθητων/κολιστίνη-ανθεκτικών, γενετικά σχετιζόμενων μεταξύ τους, κλινικών στελεχών *A. baumannii*, προερχόμενα το καθένα από τον ίδιο ασθενή.

3. Η πολυκεντρική επιδημιολογική διερεύνηση μιας μεγάλης συλλογής ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν από 11 νοσοκομεία σε 8 γεωγραφικές περιοχές σε όλη την Ελλάδα, κατά τη διάρκεια του 2015. Στη συλλογή αυτή μελετήθηκαν οι φαινότυποι αντοχής με έμφαση στις καρβαπενέμες, μινοκυκλίνη/τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη, ενώ αναζητήθηκαν οι επικρατούντες μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες, η γενετική συγγένεια και η κλωνική εξέλιξη των στελεχών.

II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βακτηριακά στελέχη

Κατά τη διάρκεια της διατριβής, μελετήθηκαν συνολικά 216 πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν κατά την περίοδο μεταξύ 2008 και 2015 από κλινικά δείγματα ασθενών διαφόρων νοσηλευτικών ιδρυμάτων της Βόρειας, Δυτικής, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας. Αναλυτικότερα, τα νοσοκομεία από τα οποία προήλθαν τα στελέχη είναι: Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο (ΠΓΝ) Αλεξανδρούπολης (10 στελέχη), Γενικό Νοσοκομείο (ΓΝ) Σερρών (32), ΠΓΝ Θεσσαλονίκης “ΑΧΕΠΑ” (16), ΠΓΝ Ιωαννίνων (20), ΠΓΝ Λάρισας (8), Γενική Κλινική Ιασώ Θεσσαλίας (6), ΓΝ Πειραιά “Τζάνειο” (29), ΓΝ Αθηνών “Ευαγγελισμός” (22), ΓΝ Αττικής “ΚΑΤ” (20), ΓΝ Αθηνών “Γ. Γεννηματάς” (20), Ευγενίδειο Θεραπευτήριο του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (15) και ΠΓΝ Ηρακλείου (18). Η αρχική φαινοτυπική ταυτοποίηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές και αυτοματοποιημένα συστήματα [κυρίως το σύστημα Vitek 2 και σε 31 στελέχη το σύστημα Microscan (Beckman-Coulter, Inc)]. Επίσης, ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έγινε αρχικά χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένα μηχανήματα. Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες.

Αρκετά από αυτά είχαν επιλεγεί έτσι ώστε να εμφανίζουν αντοχή στην κολιστίνη, η οποία συχνά αποτελεί το μόνο δραστικό αντιβιοτικό για τη θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων.

Στο σύνολο των στελεχών, το 58,8% (127 στελέχη) προήλθε από τη ΜΕΘ, το 19,9% (43) από Κλινικές του Παθολογικού Τομέα, το 15,7% (34) από Κλινικές του Χειρουργικού Τομέα, το 1,9% (4) από Κέντρο Αποκατάστασης και Αποθεραπείας και το 3,7% (8) από εξωτερικούς ασθενείς. Όσον αφορά στην πηγή απομόνωσης, το 45,4% των στελεχών (98 στελέχη) προήλθε από αίμα, 21,8% (47) από πτύελα και βρογχικές εκκρίσεις, 12% (26) από τραύματα και κατακλίσεις, 8,3% (18) από ούρα και 12,5% (27) από διάφορα υλικά.

Τα πρότυπα στελέχη *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 και *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό έλεγχο σε όλες τις μεθόδους προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας. Για την ανίχνευση του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like}, το πρότυπο στέλεχος ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος ελέγχου, ενώ για την ανίχνευση των γονιδίων *bla*_{OXA-58-like} και *bla*_{OXA-23-like} χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *A. baumannii* Ab221 και Ab601, τα οποία προηγουμένως είχαν ταυτοποιηθεί στο Εργαστήριό μας ότι είναι θετικά για τα αντίστοιχα γονίδια. Επίσης, το *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος ελέγχου στις *in vitro* δοκιμασίες μελέτης του ρυθμού ανάπτυξης, ανταγωνισμού και παραγωγής βιομεμβράνης.

Η συλλογή περιείχε ένα στέλεχος *A. baumannii* ανά ασθενή, με εξαίρεση τα δύο ζεύγη στελεχών που προαναφέρθηκαν. Πριν τη χρήση τους στη μελέτη, τα στελέχη αποθηκεύτηκαν σε ζωμό brain heart infusion με περιεκτικότητα γλυκερόλης 15%, στους -80°C.

2. Ταυτοποίηση των στελεχών της συλλογής

Η προκαταρκτική ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με αυτοματοποιημένα συστήματα (κυρίως το Vitek 2). Ωστόσο, όπως ήδη προαναφέρθηκε, τα αυτοματοποιημένα συστήματα αδυνατούν να κάνουν διαχωρισμό μεταξύ των ειδών *A. baumannii*, *A. pittii* και *A. nosocomialis*, τα οποία περιλαμβάνονται στο *A. baumannii* group, και ταυτοποιούν και τα τρία αυτά είδη ως *A. baumannii*. Έτσι λοιπόν, η ταυτοποίηση του είδους ως *A. baumannii* επιβεβαιώθηκε σε όλα τα στελέχη της συλλογής με τη μοριακή ανίχνευση της χρωμοσωμικά επαγωγίμης οξακιλλινάσης *bla*_{OXA-51-like} με PCR (86) και σε επιλεγμένα στελέχη με τη μοριακή επιδημιολογική μέθοδο MLST (ταξινόμηση σε ειδικούς για το *A. baumannii* ST τύπους), όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η PCR είναι γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία βασίζεται στον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας με τη βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) και μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης. Οι εκκινητές (forward ή εμπρόσθιος και reverse ή ανάστροφος) είναι συμπληρωματικοί με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικούς θερμοκυκλοποιητές και κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια: την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation) με θέρμανση στους 95°C, τον υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου (annealing) με ψύξη του δείγματος στους 50-60°C και τέλος την επιμήκυνση των εκκινητών (extension-elongation) στους 72°C από τη θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται, έτσι ώστε μετά από αρκετούς κύκλους προκύπτει μεγάλος αριθμός αντιγράφων του DNA στόχου.

Στην παρούσα διατριβή, η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην ανίχνευση του ενδογενούς γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} για την ταυτοποίηση του είδους *A. baumannii* (86). Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία για τον πολλαπλασιασμό ολόκληρου (825 bp) ή μέρους (353 bp) του γονιδίου, οι οποίοι παρατίθενται στους Πίνακες 2 και 6, αντίστοιχα, μαζί με τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν.

Επίσης, η τεχνική της PCR εφαρμόστηκε στην ανίχνευση γονιδίων αντοχής (καρβαπενεμάσες, γονίδια που σχετίζονται με την αντοχή στην κολιστίνη) καθώς και στις διάφορες μεθόδους τυποποίησης (MLST, 2 multiplex PCRs, SBT), όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Σε όλες τις περιπτώσεις το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 0.4 μM από κάθε εκκινητή, 0.2 mM από το κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), ρυθμιστικό διάλυμα 1X Paq5000 DNA Polymerase Buffer που περιείχε την κατάλληλη συγκέντρωση Mg^{++} , 2.5 U πολυμεράση Paq5000 DNA Polymerase (Agilent Technologies) και περίπου 100 ng γενωμικό DNA, σε τελικό όγκο 50 μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή Mini Cyclor της MJ Research. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 min και ακολουθούσαν 30 κύκλοι που ο καθένας περιελάμβανε αποδιάταξη στους 95°C για 20 sec, υβριδισμό των εκκινητών στους 46 έως 57°C (ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών) για 20 sec και επιμήκυνση στους 72°C. Αμέσως μετά το πέρας των 30 κύκλων ακολουθούσε η τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min. Σε κάθε περίπτωση, μετά την ολοκλήρωση της

PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% και τα βαμμένα με βρωμιούχο αιθίδιο προϊόντα κατέστησαν ορατά στο υπεριώδες φως.

2.2. Εκχύλιση του βακτηριακού DNA

Η εξαγωγή του γενωμικού DNA που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκε με το QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Εν συντομία, λίγες αποικίες καθαρού καλλιεργήματος μικροβίου εναιωρήθηκαν σε 180 µl λυτικού διαλύματος (Buffer ATL). Προστέθηκαν 20 µl Proteinase K, έγινε ανάδευση και το δείγμα επώαστηκε στους 56°C για 2 h. Έπειτα, προστέθηκαν 200 µl λυτικού διαλύματος (Buffer AL), έγινε ομογενοποίηση του μείγματος με ανάδευση και ακολούθως επώαση στους 70°C για 10 min. Ακολούθησε η προσθήκη 200 µl αιθανόλης (96–100%) και καλή ανάδευση του μείγματος. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη εκχύλισης (QIAamp Mini spin column), η οποία είχε τοποθετηθεί σε σωληνάριο των 2 ml. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 8000 rpm και ακολούθως μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο. Προστέθηκαν 500 µl διαλύματος πλύσεως (Buffer AW1) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 min. Έπειτα, προστέθηκαν 500 µl διαλύματος πλύσεως (Buffer AW2) και η στήλη φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 3 min. Ακολούθησε μία επιπλέον φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 1 min, για την καλύτερη δυνατή απομάκρυνση των υπολειμμάτων των διαλυμάτων έκπλυσης. Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο, προστέθηκαν 200 µl διαλύματος εκπλύσεως (Buffer AE), έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 min. Η στήλη απορρίφθηκε και το σωληνάριο που περιείχε πλέον το κεκαθαρισμένο γενωμικό DNA συντηρήθηκε στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

3. Μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, οι μέθοδοι προσδιορισμού της ευαισθησίας στην κολιστίνη παρουσιάζουν ποικίλα προβλήματα. Για τον λόγο αυτόν, δόθηκε εξ' αρχής μεγάλη έμφαση στον καθορισμό της καταλληλότερης μεθόδου για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στην κολιστίνη στα στελέχη της μελέτης μας. Οι περισσότερες μελέτες που διερευνούν την ακρίβεια των μεθόδων ευαισθησίας στην κολιστίνη χρησιμοποιούν, κατά κύριο λόγο,

συλλογές αποτελούμενες από ευαίσθητα Gram-αρνητικά βακτήρια, ενώ σπάνια οι μέθοδοι αυτές έχουν εφαρμοστεί σε ανθεκτικά στην κολιστίνη βακτήρια.

Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκαν συγκριτικά έξι πρότυπες και εμπορικές μέθοδοι προσδιορισμού της MIC στην κολιστίνη σε μια συλλογή CRAB στελεχών, τα οποία είχαν αυξημένες MICs στην κολιστίνη σύμφωνα με τον προκαταρκτικό έλεγχο ρουτίνας.

3.1. Βακτηριακά στελέχη της μελέτης

Μελετήθηκαν 20 κλινικά CRAB στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν από τέσσερα Ελληνικά νοσοκομεία (ΓΝ Αθηνών “Ευαγγελισμός”, ΓΝ Πειραιά “Τζάνειο”, ΠΓΝ Λάρισας, ΓΝ Σερρών) κατά την περίοδο 2008-2013. Τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από ασθενείς με μικροβιαμίες (45%), λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού (20%), λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (15%) και άλλες λοιμώξεις (20%). Λόγω της μη ευαισθησίας στις καρβαπενέμες, η κολιστίνη κρίθηκε αναγκαία για τη θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων. Ωστόσο, κατά τον καθιερωμένο έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, που πραγματοποιήθηκε στη ρουτίνα των συμμετεχόντων Εργαστηρίων και βασίστηκε κυρίως σε αυτοματοποιημένα συστήματα, τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως μη ευαίσθητα στην κολιστίνη (MIC >2 μg/ml). Λόγω των προαναφερθέντων προβλημάτων και δυσκολιών που παρουσιάζει ο έλεγχος ευαισθησίας στην κολιστίνη, τα στελέχη εστάλησαν στο Εργαστήριό μας για την περαιτέρω αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ευαισθησίας και επιβεβαίωση ότι η κολιστίνη δεν μπορούσε πράγματι να χρησιμοποιηθεί για τις λοιμώξεις που αυτά προκάλεσαν. Πριν από τη χρήση τους στη μελέτη τα στελέχη είχαν αποθηκευθεί σε ζωμό γλυκερόλης στους -80°C και ανακαλλιεργήθηκαν σε MHA δύο φορές πριν από τις δοκιμές ευαισθησίας.

3.2. Μοριακός έλεγχος για την ανίχνευση καρβαπενεμασών

Αρχικά, η αντοχή των στελεχών στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη) επιβεβαιώθηκε με Etest. Ακολούθως, στα στελέχη πραγματοποιήθηκε PCR για όλα τα γονίδια που κωδικογραφούν για γνωστές καρβαπενεμάσες τύπου οξακιλλινάσης (*bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like}) και μεταλλο-β-λακταμάσης (*bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{SIM}), σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Οι εκκινητές, το μέγεθος των προϊόντων και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Εκκινητές για την ανίχνευση καρβαπενεμασών

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
Complete ORF of <i>bla</i>_{OXA-51-like}	5'OXA-51-like-all-F	ATGAACATTAAAGCACTC	825	95°C 2 min 95°C 20 sec 46°C 20 sec 72°C 30 sec	*30 (247)
	3'OXA-51-like-all-R	CTATAAAATACCTAATTGTTC		72°C 5 min	
<i>bla</i>_{OXA-23-like}	F R	GATGTGTCATAGTATTCGTCG TCACAACAACATAAAAGCACTG	1062	95°C 2 min 95°C 20 sec	*30 (220)
<i>bla</i>_{OXA-40-like}	F R	GTACTAATCAAAGTTGTGAA TTCCCTAACATGAATTTGT	1023	53°C 20 sec 72°C 30 sec 72°C 5 min	
<i>bla</i>_{OXA-58-like}	OXA-58A OXA-58B	CGATCAGAATGTTCAAGCGC ACGATTCTCCCCTCTGCGC	528		(312)
<i>bla</i>_{IMP-like}	IMP-F IMP-R	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG AACCAGTTTTGCCTTACCAT	587	95°C 2 min 95°C 20 sec	*30 (313)
<i>bla</i>_{VIM-like}	VIM-F VIM-B	TGGGCCATTTCAGCCAGATC ATGGTGTTTGGTCGCATATC	510	55°C 20 sec 72°C 30 sec 72°C 5 min	
<i>bla</i>_{SIM-1}	SIM1-F SIM1-R	TACAAGGGATTTCGGCATCG TAATGGCCTGTTCCCATGTG	552		(261)

3.3. Μέθοδοι *in vitro* προσδιορισμού της MIC στην κολιστίνη

Οι δοκιμές *in vitro* προσδιορισμού της MIC στην κολιστίνη βασίστηκαν σε πρότυπες και εμπορικές μεθόδους. Αναλυτικότερα, οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν είναι η BMD, η BMD-P80, η AD, η μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης με δύο διαφορετικές ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (Etest και MTS) και το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2.

Οι πρότυπες μέθοδοι αραιώσεως σε ζωμό και άγαρ διεξήχθησαν σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (141, 302), με τη χρήση σκόνης θευκής κολιστίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Αριθμός παρτίδας: SLBK0713V), η οποία ανασυστάθηκε σε αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό αμέσως πριν από τη χρήση, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, έτσι ώστε τελικά να παρασκευαστεί μητρικό διάλυμα (stock solution) κολιστίνης συγκέντρωσης 5,120 µg/ml.

Η μέθοδος BMD διεξήχθη σε πλάκα μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου των 96 βοθρίων με στρογγυλό (σε σχήμα U) πυθμένα (Costar 3799; Corning, NY, USA), με ενοφθαλμισμό βακτηριακού εναιωρήματος 5×10^5 CFU/ml (100 μ l από αραιώση 1:100 εναιωρήματος θολερότητας 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland) σε ζωμό Mueller Hinton II με ρύθμιση κατιόντων Ca^{++} και Mg^{++} (cation-adjusted Mueller Hinton broth II, CAMHB, Sigma-Aldrich). Για τη μέθοδο BMD-P80 ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την BMD με τη διαφορά ότι στο ζωμό προστέθηκε 0.002% P80 (Sigma-Aldrich). Και στις δύο περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις που ελέγχθησαν κυμαίνονταν από 128 έως 0.125 $\mu\text{g/ml}$ σε υποδιπλάσιες αραιώσεις.

Για τη μέθοδο AD παρασκευάστηκαν τρυβλία MHA (Sigma-Aldrich), τα οποία περιείχαν κολιστίνη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.125 έως 128 $\mu\text{g/ml}$ και ακολούθησε ενοφθαλμισμός μικροβιακού εναιωρήματος με συγκέντρωση 10^4 CFU (10 μ l από αραιώση 1:100 εναιωρήματος θολερότητας 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland).

Για τη μέθοδο κλιμακωτής διάχυσης χρησιμοποιήθηκαν ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης κολιστίνης (Etest και MTS) με εύρος από 0.016 έως 256 $\mu\text{g/ml}$ σε τρυβλία MHA (Sigma-Aldrich), ακολουθώντας τις οδηγίες των κατασκευαστριών εταιρειών. Οι προκύπτουσες MICs που βρίσκονταν στο ενδιάμεσο φάσμα μεταξύ υποδιπλάσιων αραιώσεων στρογγυλοποιήθηκαν στην αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως συνιστάται για τη μέθοδο κλιμακωτής διάχυσης.

Για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη με το σύστημα Vitek 2 (εύρος MIC ≤ 0.5 έως ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) χρησιμοποιήθηκε η κάρτα AST-EXN8 (bioMérieux), σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Για την ανάλυση των δεδομένων, οι MICs από το Vitek 2 με τιμές ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ θεωρήθηκαν ως 16 $\mu\text{g/ml}$ στις περιπτώσεις που κρίθηκε απαραίτητο.

Όλες οι μέθοδοι διεξήχθησαν ταυτόχρονα, χρησιμοποιώντας το ίδιο αρχικό βακτηριακό εναιώρημα του κάθε στελέχους (θολερότητας 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland) για την καθεμία μέθοδο. Οι δοκιμές ευαισθησίας επωάστηκαν στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$ για 18 έως 20 ώρες και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές. Ως τιμή MIC θεωρήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεψε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τα πρότυπα στελέχη *E.coli* ATCC 25922 και *P. aeruginosa* ATCC 27853 χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό έλεγχο σε όλες τις μεθόδους ευαισθησίας, σύμφωνα με τις συστάσεις του CLSI (140). Επιπλέον, στον έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιήθηκε το ευαίσθητο στην κολιστίνη πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606 και ένα ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος *A. baumannii* του Εργαστηρίου μας (Ab249).

3.4. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ανάλυση δεδομένων

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα όρια ευαισθησίας της EUCAST για τα *A. baumannii* (ευαίσθητα: MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, ανθεκτικά: MIC > 2 $\mu\text{g/ml}$) (139). Να σημειωθεί, ωστόσο, ότι και τα ερμηνευτικά κριτήρια που προτείνει το CLSI για τα *A. baumannii* (ευαίσθητα: MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, ανθεκτικά: MIC ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) (140) πρακτικά δεν διαφέρουν σε σχέση με αυτά της EUCAST. Για την κάθε μέθοδο υπολογίστηκαν η MIC₅₀ και η MIC₉₀, οι οποίες αντιστοιχούν στην ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του 50% και του 90%, αντίστοιχα, των μικροβιακών στελεχών.

Η ανάλυση των δεδομένων περιελάμβανε τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από καθεμιά από τις μεθόδους ελέγχου ευαισθησίας BMD-P80, AD, Etest, MTS και Vitek 2 με αυτά που παρήγαγε η BMD, η οποία θεωρήθηκε η πρότυπη μέθοδος αναφοράς. Υπολογίστηκε η βασική συμφωνία (Essential agreement, EA), η συμφωνία κατηγοριοποίησης (Categorical agreement, CA) και τα ποσοστά σφαλμάτων [πολύ σημαντικά (very major errors, VME) και σημαντικά (major errors, ME)]. Η EA ορίζεται ως το ποσοστό των MICs που διαφέρουν κατά μία υποδιπλάσια αραίωση ($\pm 1 \log_2$ dilution) από την MIC που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αναφοράς BMD. Ως CA ορίζεται το ποσοστό των στελεχών που κατατάσσονται στην ίδια κατηγορία ευαισθησίας (ευαίσθητο, ανθεκτικό) με την BMD και την υπό αξιολόγηση μέθοδο. Ο όρος VME δηλώνει το ψευδώς ευαίσθητο αποτέλεσμα, δηλαδή περιπτώσεις στις οποίες η μέθοδος BMD αναδεικνύει αντοχή, ενώ η υπό εκτίμηση μέθοδος ευαισθησία. Ο όρος ME σημαίνει το ψευδώς ανθεκτικό αποτέλεσμα, δηλαδή εκείνες τις περιπτώσεις στις οποίες η μέθοδος BMD καταδεικνύει ευαισθησία, ενώ η υπό αξιολόγηση μέθοδος αντοχή (316). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για την εκτίμηση των σφαλμάτων χρησιμοποιήθηκε ως παρονομαστής ο συνολικός αριθμός των στελεχών, για να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση των σημαντικών σφαλμάτων που θα προέκυπτε επειδή η συλλογή μας περιελάμβανε κυρίως ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη.

Η αξιολόγηση της αποδεκτής απόδοσης των μεθόδων έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια που καθορίζονται από τον Διεθνή Οργανισμό Προτυποποίησης (International Organization for Standardization, ISO) ως εξής: $\geq 90\%$ για την EA ή την CA, και $\leq 3\%$ για τα VME και ME (317). Για την αξιολόγηση σημαντικών διαφορών μεταξύ των μεθόδων ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας το Student's *t* test (IBM SPSS Statistics, 2013, Version 22.0, Armonk, NY; IBM Corp.). Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμή $P < 0.05$.

4. Φαινοτυπική και μοριακή μελέτη και διερεύνηση της λοιμογόνου δύναμης κλινικών στελεχών *A. baumannii* ανθεκτικών στην κολιστίνη

Μετά τη διερεύνηση των μεθόδων προσδιορισμού ευαισθησίας στην κολιστίνη ακολούθησε η μελέτη φαινοτυπικών, γενωμικών και παθογενετικών μεταβολών που σχετίζονται με την ανάπτυξη της αντοχής. Η μελέτη αυτή εκτελέστηκε σε οκτώ ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν σε τρεις διαφορετικές περιοχές (Αθήνα, Λάρισα, Σέρρες). Στα στελέχη αυτά έγινε μοριακή ανίχνευση των μηχανισμών της αντοχής στην κολιστίνη και μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης.

Κυρίως όμως η συγκεκριμένη μελέτη εστίασε το ενδιαφέρον της στη διερεύνηση φαινοτυπικών και γενωμικών χαρακτηριστικών σε δύο ζεύγη κολιστίνη-ευαίσθητων/κολιστίνη-ανθεκτικών (ColS/ColR), γενετικά σχετιζόμενων μεταξύ τους, κλινικών στελεχών *A. baumannii*, προερχόμενα το καθένα από τον ίδιο ασθενή. Αρχικά, διερευνήθηκαν τα ιστορικά των ασθενών από τους οποίους προήλθαν τα στελέχη και έγινε μοριακή ανίχνευση των μηχανισμών της αντοχής στην κολιστίνη. Στη συνέχεια, το ColS συγκρίθηκε με το ColR στέλεχος του κάθε ζεύγους από την άποψη των φαινοτυπικών ιδιοτήτων που έχουν σχέση με τη λοιμογόνο δύναμη, όπως η ικανότητα ανάπτυξης και η ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης. Τέλος, έγινε αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος των ColS/ColR στελεχών των δύο ζευγών και σύγκριση μεταξύ τους, με ιδιαίτερη έμφαση στα γονίδια που εμπλέκονται στη λοιμογόνο δύναμη και την παραγωγή βιομεμβράνης.

4.1. Βακτηριακά στελέχη της μελέτης

Στη μελέτη περιλήφθηκαν οκτώ ColR στελέχη *A. baumannii* (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8). Επίσης, περιλήφθηκε μεγάλη σειρά ColS/ColR κλινικών στελεχών *A. baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν διαδοχικά από διάφορα κλινικά δείγματα δύο ασθενών κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους. Το πρώτο ColS στέλεχος και το πρώτο ColR στέλεχος από κάθε ασθενή επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Το πρώτο ζευγάρι στελεχών (Ab299/Ab347) απομονώθηκε από βρογχικές εκκρίσεις και το δεύτερο (Ab248/Ab249) από πύο χειρουργικού τραύματος, αντίστοιχα, δύο ασθενών που νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ για μεγάλο χρονικό διάστημα και έλαβαν κολιστίνη για αρκετές ημέρες μεταξύ των δύο

απομονώσεων. Επίσης, το ευαίσθητο στην κολιστίνη *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος ελέγχου.

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (β-λακταμικά, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες, τιγκεκυκλίνη, ριφαμπικίνη, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη) έγινε με τον προσδιορισμό της MIC με Etest. Ο προσδιορισμός της MIC στην κολιστίνη έγινε αρχικά με Etest και ακολούθως με τη μέθοδο μακροαραιώσεων του αντιβιοτικού σε ζωμό (broth macrodilution), χρησιμοποιώντας γυάλινα σωληνάρια και ακολουθώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες του CLSI (318). Να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία, η μέθοδος μακροαραιώσεων σε ζωμό παρουσιάζει εξαιρετική απόδοση για τον έλεγχο της MIC στην κολιστίνη σε πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* (154).

4.2. Σταθερότητα του φαινοτύπου αντοχής στην κολιστίνη

Η σταθερότητα του φαινοτύπου αντοχής στην κολιστίνη μελετήθηκε με ανακαλλιέργειες των ColR στελεχών για επτά συνεχόμενες ημέρες σε υγρό θρεπτικό υλικό CAMHB χωρίς αντιβιοτικό. Μετά από κάθε ανακαλλιέργεια προσδιορίστηκαν οι MICs στην κολιστίνη με τη μέθοδο μακροαραιώσεων σε ζωμό, σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (318).

4.3. Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης

- Τυποποίηση με PFGE

Για τη μελέτη της κλωνικής συγγένειας, έγινε τυποποίηση με PFGE του χρωμοσωμικού DNA των οκτώ ColR στελεχών και όλων των ColS/ColR στελεχών που απομονώθηκαν από τους δύο ασθενείς μετά από πέψη τους με το ένζυμο *ApaI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany). Το ένζυμο αυτό είναι μια περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει σπάνιες θέσεις του χρωμοσώματος και το κόβει σε θραύσματα μεγάλου μεγέθους. Στη συνέχεια, τα θραύσματα διαχωρίζονται με την ηλεκτροφόρηση ανάλογα με το μέγεθός τους σε ευδιάκριτες ηλεκτροφορητικές ζώνες (μπάντες), με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα ηλεκτροφορητικό πρότυπο για κάθε στέλεχος. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Αρχικά επιλέχθηκε μία αποικία από πρόσφατο καλλιέργημα του κάθε στελέχους σε MHA και ανακαλλιεργήθηκε σε 5 ml Tryptic Soy Broth (Biolife, Milan, Italy). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση με ανάδευση στους 37°C.
- Στη συνέχεια, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 3500 rpm για 5 min, απορρίφθηκε το

υπερκείμενο και έγινε ανασύσταση του ιζήματος με ρυθμιστικό διάλυμα PIV (0.01 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl), ώστε να προκύψει εναιώρημα θολερότητας 5.0 της πρότυπης κλίμακας McFarland. Ακολούθησε φυγοκέντρωση του εναιωρήματος στις 13000 rpm για 3 min, απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε 200 μl PIV.

- Παρασκευάστηκε διάλυμα αгарόζης χαμηλού σημείου τήξεως (Low Melting Temperature Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) 2% σε 10 ml διάλυμα PIV και διατηρήθηκε σε υδατόλουτρο στους 42°C μαζί με τα εναιωρημένα στελέχη για τουλάχιστον 10 min.

- Όγκος 100 μl πηκτής αгарόζης αναμείχθηκε με 100 μl δείγματος. Παρασκευάστηκαν πλακίδια (plugs) αποτελούμενα από 20 μl μείγματος αгарόζης-μικροβίου (7-8 πλακίδια για κάθε στέλεχος), τα οποία τοποθετήθηκαν επάνω σε γυάλινο εκμαγείο και καλύφθηκαν άμεσα με γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες. Το εκμαγείο με τα πλακίδια τοποθετήθηκε στους -20°C για 5 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

- Τα πλακίδια επώστηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιείχαν 1 ml διαλύματος EC (6 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.2% Na deoxycholate, 0.5% Na laurylsarcosine), 100 μg/ml λυσοζύμη (lysozyme, Sigma-Aldrich) και 50 μg/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) στους 37°C για τουλάχιστον 3 h με ανάδευση, έτσι ώστε να καταστραφεί το τοίχωμα των μικροβιακών κυττάρων.

- Μετά την αφαίρεση του διαλύματος EC, προστέθηκε στα σωληνάρια 1 ml διαλύματος ESP (0.5 M EDTA pH 9.0, 1% sarcosyl), το οποίο περιείχε 1 mg/ml πρωτεΐνωση K (περιεκτικότητας 40 U/mg, Bioline). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση των πλακιδίων στους 50°C, ώστε να πραγματοποιηθεί πέψη των κυτταρικών πρωτεϊνών.

- Αφαιρέθηκε το διάλυμα ESP και ακολούθησαν 5 διαδοχικές πλύσεις των πλακιδίων με 2 ml διαλύματος TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0) ανά 30 min με ανάδευση, ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα της πρωτεΐνωσης K και των πρωτεϊνών. Ακολούθως, τα πλακίδια φυλάχθηκαν σε διάλυμα TE στους 4°C.

- Ακολούθησε η πέψη του DNA με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* (10 U/μL, Fermentas). Για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκε ένα πλακίδιο, το οποίο τοποθετήθηκε σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tango 1X που περιείχε 80U *ApaI*. Τα δείγματα επώστηκαν ολονύχτια στους 30°C.

- Η πέψη αναστάληκε με την προσθήκη σε κάθε δείγμα 10 μl χρωστικής 10X Blue Juice Loading Buffer (65% w/v sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.3% w/v Bromophenol Blue) και την τοποθέτηση των πλακιδίων στους 4°C για 10 min. Τα πλακίδια της αгарόζης-DNA τοποθετήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%, η οποία παρασκευάστηκε

χρησιμοποιώντας ειδική αгарόζη για ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (agarose for pulsed field electrophoresis running gel, Sigma-Aldrich) και 0.5X TBE (BioRad, Hercules, CA, USA).

- Η πηκτή ηλεκτροφορήθηκε στη συσκευή CHEF-DRIII (BioRad) με 2 lt 0.5X TBE και στις εξής συνθήκες: initial switch time 5 sec, final switch time 35 sec, total time 20 h, 6 Volts/cm, 120° angle, temperature 11.3°C. Το εμπορικό σκεύασμα Pulse Marker™ 50-1,000 kb (Sigma-Aldrich) που περιέχει τεμάχια γενώματος λ φάγου γνωστών μεγεθών χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακού βάρους. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης έγινε χρώση της πηκτής αгарόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml για 30 min. Ακολούθησε αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος και το ηλεκτροφόρημα παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε σε UV ακτινοβολία.

Η ανάλυση των γενετικών αποτυπωμάτων των στελεχών έγινε οπτικά, εφαρμόζοντας τα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια που προτάθηκαν από τον Tenover *et al.* (108).

- Τυποποίηση με το σχήμα MLST του Ινστιτούτου Pasteur

Στα οκτώ ColR στελέχη και στα πρώτα ColS/ColR στελέχη που απομονώθηκαν από κάθε έναν από τους δύο ασθενείς ακολούθησε MLST με το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur (126) και καθορίστηκε ο MLST (ST) τύπος. Πρόκειται για σχήμα τυποποίησης με τη χρήση αλληλούχισης, το οποίο βασίζεται στο μοριακό πολλαπλασιασμό και ταυτοποίηση των νουκλεοτιδίων επτά απαραίτητων για την επιβίωση (housekeeping), γενετικά σταθερών γονιδίων: *cpn60* (60-KDa chaperonin), *fusA* (elongation factor EF-G), *gltA* (citrate synthase), *pyrG* (CTP synthase), *recA* (homologous recombination factor), *rplB* (50S ribosomal protein L2) και *rpoB* (RNA polymerase subunit B). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR και την αλληλούχιση φαίνονται στον Πίνακα 3.

Σε όλα τα γονίδια εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες για την PCR, οι οποίες είναι: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 min και ακολούθησαν 30 κύκλοι επαναλήψεων με 95°C για 20 sec, 50°C για 20 sec, 72°C για 30 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min.

Πίνακας 3. Εκκινητές για την τυποποίηση με τη μέθοδο MLST του Ινστιτούτου Pasteur

Γονίδιο	Εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>cpn60</i>	cpn60:F:cpn60F ACTGTACTTGCTCAAGC cpn60:F:cpn60R TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	405
<i>fusA</i>	fusA:F:fusA7 ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT fusA:R:fusA8 CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT	633
<i>gltA</i>	gltA:F:gltAF AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC gltA:R:gltAR GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	483
<i>pyrG</i>	pyrG:F:pyrG7 GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG pyrG:R:pyrG8 ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	297
<i>recA</i>	recA:F:RA1 CCTGAATCTTCYGGTAAAAC recA:R:RA2 GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	372
<i>rplB</i>	rplB:F:rplB7 GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC rplB:R:rplB8 CACCACCACCRGTGYGGGTGATC	330
<i>rpoB</i>	rpoB:F:Vic4 GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA rpoB:R:Vic6 GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC	456

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση, καθαρισμός των προϊόντων της PCR για την απομάκρυνση αλάτων, εκκινητών, dNTPs και άλλων μη νουκλεϊκών αντιδραστηρίων και αλληλούχιση. Ο καθαρισμός έγινε χρησιμοποιώντας το Purelink PCR Purification Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) εφαρμόζοντας το προτεινόμενο από τον κατασκευαστή πρωτόκολλο. Αναλυτικότερα, σε 40 μl προϊόντος PCR προστέθηκαν 160 μl ρυθμιστικού διαλύματος καθαρισμού PureLink Binding Buffer με ισοπροπανόλη και ακολούθησε ελαφρά ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε μία στήλη PureLink Spin Column και ακολούθησε η φυγοκέντρησή της στα 10000 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να προσδεθεί το δίκλωνο DNA στη στήλη. Στη στήλη προστέθηκαν 650 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσεως Wash Buffer με αιθανόλη και ακολούθησε η φυγοκέντρησή της στα 10000 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 min, για να

απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στο κέντρο της στήλης 50 μ l διαλύματος έκλουσης Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) και η στήλη επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρωση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα έκλουσης με το καθαρό PCR προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA κατά Sanger πραγματοποιήθηκε και στις δύο αλυσίδες για κάθε γονίδιο από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών (Macrogen Inc., Seoul, South Korea) με τη χρήση του λογισμικού DNASTar software (version 5.07; Lasergene, Madison, WI). Ο προσδιορισμός του ST τύπου για κάθε στέλεχος έγινε με την εισαγωγή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των επτά γονιδίων στον ιστότοπο <http://pubmlst.org/abaumannii/>.

4.4. Μοριακός έλεγχος καρβαπενεμασών και γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στην κολιστίνη

Σε όλα τα στελέχη διενεργήθηκε PCR για όλα τα γονίδια που κωδικογραφούν γνωστές καρβαπενεμάσες (*bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{SIM}), χρησιμοποιώντας τους εκκινητές και τις συνθήκες που αναφέρθηκαν στον Πίνακα 2. Ακολούθησε PCR για τον έλεγχο των γονιδίων που ενοχοποιούνται για την αντοχή στην κολιστίνη: *pmrA*, *pmrB*, *pmrC*, *lpxA*, *lpxC* και *lpxD* (285, 287). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 4. Για την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες όλων των προϊόντων της PCR αναλύθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger από την εταιρεία Macrogen. Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank, η οποία διατίθεται από το NCBI (National Center for Biotechnology Information). Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε η μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Πίνακας 4. Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στην κολιστίνη

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')	Θεμοκρασία υβριδισμού (°C)	Αναφορά
<i>pmrA</i>	pmrA-F pmrA-R	ATGACAAAAATCTTGATGATTGAAGAT TTATGATTGCCCAAACGGTAG	52	(285)
<i>pmrB</i>	pmrB-F pmrB-R pmrB2-F pmrB2-R	GTGCATTATTCATTAAAAAAAC TCACGCTCTTGTTTCATGTA GGTTCGTGAAGCTTTCG CCTAAATCGATTTCCTTTTG	50	(285)
<i>pmrC</i>	pmrC-F pmrC-R pmrC2-F pmrC2-R	ATGTTTAATCTCATTATAGCCA TTAGTTTACATGGGCACAA GGTTGTTATTGAAGAAAGTAT TCAATCCAAGTCACTTGGTAAC	50	(285)
<i>lpxA</i>	BAP6098 BAP6099	TGAAGCATTAGCTCAAGTTT GTCAGCAAATCAATACAAGA	50	(287)
<i>lpxD</i>	BAP6197 BAP6198	CAAAGTATGAATACAACCTTTTGAG GTCAATGGCACATCTGCTAAT	51	(287)
<i>lpxC</i>	BAP6402 BAP6403	TGAAGATGACGTTCTGCAA TGGTGAAAATCAGGCAATGA	51	(287)

4.5. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *pmrCAB* με ποσοτική real-time RT-PCR

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR αντίστροφης τρανσκριπτάσης σε πραγματικό χρόνο (quantitative reverse transcription real-time-PCR, qRT-PCR) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων RNA των γονιδίων *pmrA*, *pmrB* και *pmrC* στα δύο ζευγάρια των κλινικών στελεχών και στο ευαίσθητο στην κολιστίνη πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606 (285, 319).

Αναλυτικότερα, έγινε εξαγωγή του συνολικού κυτταρικού RNA από βακτήρια που βρισκόντουσαν στη μέση-λογαριθμική φάση της ανάπτυξης (όπως αυτό καθορίστηκε από την ανάλυση του ρυθμού ανάπτυξης) με RNeasy minikit (Qiagen, West Sussex, United Kingdom) και ακολούθησε η ποσοτικοποίησή του φασματοφωτομετρικά στα 260 nm. Οι ενδεχόμενες επιμολύνσεις από γενωμικό DNA απομακρύνθηκαν με τη δράση της DNase I

(Promega, Madison, WI, USA). Η ποσοτική RT-PCR πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit SuperScript III Platinum SYBR green one-step qRT-PCR (Invitrogen), χρησιμοποιώντας συνολικά 12 ng RNA και εκκινητές από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (285), οι οποίοι παρατίθενται στον Πίνακα 5. Το ενδογενές γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιήθηκε για την προτυποποίηση της μεθόδου. Ο έλεγχος για επιμολύνσεις από DNA έγινε συμπεριλαμβάνοντας αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε απλή Taq Polymerase αντί για αντίστροφη τρανσκριπτάση (αρνητικός μάρτυρας). Η ποσοτική PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Mx3005P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) εφαρμόζοντας τις εξής συνθήκες: ένας κύκλος στους 50°C για 3 min, ένας κύκλος στους 95°C για 5 min, 40 κύκλοι στους 95°C για 15 sec και στους 60°C για 45 sec και ένας κύκλος στους 40°C για 1 min. Για κάθε στέλεχος οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και σε τρία ανεξάρτητα πειράματα και η έκφραση των γονιδίων περιγράφηκε ως ο μέσος όρος όλων των μετρήσεων.

Πίνακας 5. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time RT-PCR

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')	Αναφορά
<i>pmrA</i>	RT-PCR pmrA-F RT-PCR pmrA-R	Ίδια με την αλληλουχία του pmrA-F CCATCATAGGCAATCCTAAATCCA	(285)
<i>pmrB</i>	RT-PCR pmrB-F RT-PCR pmrB-R	GAACAGCTGAGCACCCCTTTAA ACAGGTGGAACCAGCAAATG	(285)
<i>pmrC</i>	RT-PCR pmrC-F RT-PCR pmrC-R	CTCTTTACGCTTTGTTTTATGGAC GTAAAAAGTAAAACACCGACCA	(285)
16S rRNA	RT-PCR 16S rRNA-F RT-PCR 16S rRNA-R	TCAGCTCGTGTCTGAGATG CGTAAGGGCCATGATG	(319)

4.6. *In vitro* δοκιμασίες προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης

Ο ρυθμός ανάπτυξης μελετήθηκε στα δύο ζευγάρια των κλινικών στελεχών και στα οκτώ ColR στελέχη με δύο μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο, οι καμπύλες ανάπτυξης διεξήχθησαν σε γυάλινα σωληνάρια με ενοφθαλμισμό 5×10^5 CFU/ml εναιωρήματος μικροβίου σε ζωμό CAMHB (Sigma-Aldrich) και ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό συνεχή, ήπια ανάδευση.

Η ανάπτυξη παρακολουθήθηκε ανά 12ωρο, μέχρι τις 48 ώρες, με τη μέτρηση της θολερότητας της κλίμακας McFarland ή την απαρίθμηση των αποικιών που προέκυψαν μετά τον ενοφθαλμισμό αλληλοδιάδοχων αραιώσεων καλλιέργειας ζωμού σε MHA χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού. Το ευαίσθητο στην κολιστίνη *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος ελέγχου.

Στη δεύτερη μέθοδο, οι καμπύλες ανάπτυξης διεξήχθησαν σε μικροπλάκα πολυστυρενίου των 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα και καπάκι (Costar). Αρχικά παρασκευάστηκε εναιώρημα θολερότητας 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland σε ζωμό Luria-Bertani (LB), χρησιμοποιώντας καλλιέργειες βακτηρίων που βρίσκονταν στην εκθετική φάση της ανάπτυξης. Ακολούθησε αραιώση 1:10 του εναιωρήματος σε ζωμό LB. Στη συνέχεια, 200 μ l του αραιωμένου εναιωρήματος (περίπου 2×10^6 CFUs) ενοφθαλμίστηκαν σε κάθε βοθρίο της μικροπλάκας. Το κάθε στέλεχος εμβολιάστηκε σε οκτώ βοθρία. Το πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος ελέγχου, ενώ βοθρία που περιείχαν μόνο ζωμό LB χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό. Η μικροπλάκα τοποθετήθηκε στο φασματοφωτόμετρο Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), όπου επώαστηκε στους 37°C και παρακολουθήθηκε η ανάπτυξη με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) στα 600 nm (OD600) κάθε 15 λεπτά, για 24 ώρες. Με βάση την εκθετική φάση των καμπυλών ανάπτυξης, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) για κάθε στέλεχος προσδιορίστηκε ως ακολούθως: $\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / (t - t_0)$, όπου $\ln(N_t)$ ο φυσικός λογάριθμος της πυκνότητας του πληθυσμού στο τέλος της εκθετικής φάσης, $\ln(N_0)$ ο φυσικός λογάριθμος της πυκνότητας του πληθυσμού στην αρχή της εκθετικής φάσης και $t - t_0$ η χρονική διάρκεια της εκθετικής φάσης. Και οι δύο μέθοδοι εκτελέστηκαν εις τριπλούν, σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.

4.7. *In vitro* δοκιμασίες ανταγωνισμού

Για τη μελέτη του πιθανού κόστους προσαρμογής των ColR στελεχών σε σχέση με τα αντίστοιχα ColS στελέχη, εκτελέστηκαν *in vitro* πειράματα ανταγωνισμού στα δύο ζευγάρια των κλινικών στελεχών ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τον Bec̃eiro *et al.* (299), με λίγες τροποποιήσεις. Εν συντομία, καλλιέργειες σε ζωμό LB του ColR στελέχους και του ομολόγου του ColS στελέχους, που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης, αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 (περίπου 10^7 CFU από κάθε στέλεχος) σε 20 ml ζωμό LB. Ακολούθησε επώαση στους 37°C με ανάδευση στις 200 rpm. Μετά από 5 και 20 ώρες, αλληλοδιάδοχες αραιώσεις της υγρής καλλιέργειας ενοφθαλμίστηκαν σε LB άγαρ και

LB άγαρ με 8 $\mu\text{g/ml}$ κολιστίνης και μετά από ολονύχτια επώαση ακολούθησε απαρίθμηση του συνόλου των στελεχών (ColS και ColR) και των ColR στελεχών, αντίστοιχα. Ο αριθμός των γενεών και η σχετική ικανότητα ανάπτυξης (relative fitness) των ανταγωνιζόμενων ColS και ColR στελεχών εντός του κάθε ζεύγους υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (320). Τρία ανεξάρτητα πειράματα εκτελέστηκαν.

4.8. Έλεγχος σχηματισμού βιομεμβράνης - Στατικό και δυναμικό μοντέλο

- Στατική δοκιμασία σχηματισμού βιομεμβράνης

Για τον προσδιορισμό της αρχικής προσκόλλησης και του σχηματισμού βιομεμβράνης υπό στατικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του κρυσταλλικού ιώδους, ακολουθώντας ένα πρωτόκολλο που περιγράφηκε πρόσφατα στη βιβλιογραφία (321), αλλά με κάποιες τροποποιήσεις.

Τα εναιωρήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν παρόμοια με αυτά που παρασκευάστηκαν στις δοκιμασίες του ρυθμού ανάπτυξης. Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες βακτηρίων που βρίσκονταν στην εκθετική φάση της ανάπτυξης παρασκευάστηκε για κάθε στέλεχος εναιώρημα θολερότητας 0.5 της κλίμακας McFarland, το οποίο αραιώθηκε 1:10 σε ζωμό LB. Στη συνέχεια, 200 μl του αραιωμένου εναιωρήματος (περίπου 2×10^6 CFUs) ενοφθαλμίστηκαν σε μικροπλάκα πολυστυρενίου των 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα και καπάκι (5 επαναλήψεις/στέλεχος). Το πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, ενώ βοθρία που περιείχαν μόνο ζωμό LB χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλό. Ακολούθησε αερόβια επώαση των πλακών στους 37°C για 6 ή 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, το περιεχόμενο απορρίφθηκε και οι πλάκες πλύθηκαν 3 φορές με 200 μl /βοθρίο αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS) για την απομάκρυνση των πλαγκτονικών κυττάρων. Ακολούθησε μονιμοποίηση των βιομεμβρανών με 150 μl μεθανόλη/βοθρίο και οι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν σε ανεστραμμένη θέση σε θερμοκρασία δωματίου, για περίπου 30 λεπτά. Η βιομεμβράνη χρώστηκε με κρυσταλλικό ιώδες 0.2% (150 μl /βοθρίο) για 15 λεπτά. Κατόπιν, η περίσσεια χρωστικής απορρίφθηκε, ακολούθησε έκπλυση των πλακών με νερό βρύσης και στέγνωμά τους σε ανάρροπη θέση, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε έκλουση της χρωστικής σε 33% οξικό οξύ (150 μl /βοθρίο) και τελικά η βιομεμβράνη ποσοτικοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του εκλούσματος στα 620 nm (OD₆₂₀), χρησιμοποιώντας το φωτόμετρο Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific). Η δοκιμασία διεξήχθηκε εις τριπλούν και σε τρία ανεξάρτητα χρονικά σημεία.

- Δυναμική δοκιμασία σχηματισμού βιομεμβράνης

Η αρχική προσκόλληση ή ο σχηματισμός βιομεμβράνης σε αρχικό στάδιο μελετήθηκε επίσης κάτω από δυναμικές συνθήκες σύμφωνα με ένα πρόσφατα δημοσιευμένο πρωτόκολλο (321), με κάποιες τροποποιήσεις. Στη μέθοδο αυτή η βιομεμβράνη αναπτύχθηκε σε μικροκανάλια σε ένα σύστημα συνεχόμενης διακίνησης υγρού, το σύστημα BioFlux® (Fluxion Biosciences Inc., South San Francisco, CA). Εν συντομία, όσον αφορά στην αρχή λειτουργίας, το σύστημα αποτελείται από μία αντλία, η οποία συνδέεται στο πάνω μέρος μιας πλάκας BioFlux. Η πλάκα αυτή αποτελείται από 48 βοθρία (24 βοθρία εισόδου και 24 βοθρία εξόδου), τα οποία συνδέονται ανά ζεύγη με 24 ανεξάρτητα μικροκανάλια. Τα βοθρία εισόδου περιέχουν φρέσκο υγρό θρεπτικό υλικό, ενώ τα βοθρία εξόδου το ζωμό που έχει καταναλωθεί. Η πίεση στην επάνω επιφάνεια των βοθρίων εισόδου ωθεί το φρέσκο υγρό μέσω των μικροκαναλιών (που περιέχουν τη βιομεμβράνη) μέσα στα βοθρία εξόδου.

Το πρωτόκολλο ξεκίνησε με την προσθήκη 150 μ l ζωμού LB σε κάθε βοθρίο εισόδου μιας πλάκας BioFlux, ο οποίος διακινήθηκε προς το αντίστοιχο βοθρίο εξόδου μέσω της αντλίας, με δύναμη ροής 5 dyne/cm². Στη συνέχεια, τα ίδια εναιωρήματα των στελεχών που προετοιμάστηκαν στη στατική δοκιμασία φορτώθηκαν στην πλάκα BioFlux (5 επαναλήψεις/στέλεχος). Ο ενοφθαλμισμός εκτελέστηκε στα βοθρία εξόδου (85 μ l/στέλεχος) για να προληφθεί η επιμόλυνση των βοθρίων εισόδου. Τα βακτήρια ωθήθηκαν προς τα μικροκανάλια ασκώντας αντίθετη ροή (2 dyne/cm²) για μερικά δευτερόλεπτα και ακολούθως αφέθηκαν να προσκολληθούν για 30 λεπτά, στους 37°C. Έπειτα, προστέθηκε 1 ml ζωμού LB στα βοθρία εισόδου και η πλάκα επώαστηκε στους 37°C για 6 ώρες με ταχύτητα ροής 0.5 dyne/cm². Μετά την επώαση, η περίσσεια υγρού από τα βοθρία εισόδου και εξόδου απορρίφθηκε προσεκτικά και προστέθηκαν 400 μ l φρέσκου ζωμού σε κάθε βοθρίο εισόδου. Για το χρωματισμό των βιομεμβρανών 1 μ l φθορίζουσας χρωστικής LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen, Life Technologies) προστέθηκε σε κάθε βοθρίο εισόδου και διακινήθηκε προς το αντίστοιχο μικροκάνάλι με δύναμη ροής 0.5 dyne/cm² για 10 λεπτά. Κατόπιν, οι βιομεμβράνες οπτικοποιήθηκαν με ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss microscopes, Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany). Το πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Τρία ανεξάρτητα πειράματα εκτελέστηκαν. Οι βιομεμβράνες ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ZEN 2012 (Zeiss) και ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Τα επίπεδα του φθορισμού καταγράφηκαν ως η ολική πυκνότητα (integrated density, IntDen) επί της συνολικής επιφάνειας του καναλιού.

4.9. Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με Student's *t* test για ανεξάρτητα δείγματα (unpaired two-tailed Student's *t* test) με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics (2013, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, Armonk, NY; IBM Corp.). Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για τιμή $P < 0.05$.

4.10. Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος των ColS/ColR στελεχών

Τα δύο ζευγάρια των ColS/ColR κλινικών στελεχών *A. baumannii* υποβλήθηκαν σε WGS χρησιμοποιώντας το μηχάνημα αλληλούχισης νέας γενιάς Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA). Εν συντομία, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του γενωμικού DNA χρησιμοποιώντας το MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). Για το WGS χρησιμοποιήθηκε το kit προετοιμασίας βιβλιοθήκης Nextera XT DNA sample preparation kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας και ακολούθησε 2 X 150 bp paired-end αλληλούχιση (Illumina). Ο στόχος του πρωτοκόλλου προετοιμασίας ήταν ο ενζυματικός κατακερματισμός του DNA και η προσθήκη αλληλουχιών (adapters) στο DNA εκμαγείο σε αντίδραση μέσα στο ίδιο φιαλίδιο, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν πολυπλεκτικές βιβλιοθήκες αλληλουχίας. Η τεχνική αλληλούχισης paired-end επιτρέπει να αλληλουχηθούν και τα δύο άκρα ενός θραύσματος και δημιουργεί υψηλής ποιότητας δεδομένα.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα αναλύθηκαν ακολουθώντας μια συνδυαστική προσέγγιση που σύντομα περιγράφεται παρακάτω. Οι αλληλουχίες συναρμολογήθηκαν ανεξάρτητα (*de novo* assembly) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPAdes v3.1.0 (322) και ακολούθησε χαρτογράφηση έναντι του γνωστού γονιδιώματος του στελέχους *A. baumannii* ACICU (Accession Number CP000863). Τα παρατηρούμενα ψευδο-χρωμοσώματα συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Mauve v2.3.1 για αναδιατάξεις του γονιδιώματος. Στη συνέχεια, τα δύο ColR στελέχη συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας τα ομόλογά τους ColS στελέχη ως πρότυπα αναφοράς και η ανάλυση των SNPs πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος CLC Workbench Genomics v.7.5.1 (CLCbio, Denmark) με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους. Οι αλλαγές που ανιχνεύθηκαν με το WGS επιβεβαιώθηκαν με PCR και αλληλούχιση κατά Sanger, καθώς και την τεχνική χαρτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole genome mapping, WGM).

5. Πολυκεντρική μοριακή επιδημιολογική μελέτη ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii*

Στο τελευταίο στάδιο της διατριβής πραγματοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας μελέτη σχετικά με τη μοριακή επιδημιολογική ανάλυση CRAB στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν πρόσφατα (2015) από διάφορα νοσοκομεία σε όλη την Ελλάδα. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η εξέλιξη των στελεχών αυτών, που παρουσιάζουν έντονη εξάπλωση και αποτελούν το πιο συχνό αίτιο λοιμώξεων στις ΜΕΘ, ως προς την αντοχή τους στα αντιβιοτικά και τη γενετική τους σύσταση. Σε όλα τα στελέχη έγινε PCR για τα γονίδια αντοχής στις καρβαπενέμες και τυποποίηση με διάφορες μεθόδους. Ακόμη, προσδιορίστηκαν οι MICs στην κολιστίνη, την τιγκεκυκλίνη και τη μινοκυκλίνη με τις πρότυπες μεθόδους αραιώσεων σε ζωμό και άγαρ.

5.1. Βακτηριακά στελέχη της μελέτης

Κατά τη διάρκεια του 2015, 2.500 στελέχη *A. baumannii* απομονώθηκαν από 11 τριτοβάθμια νοσοκομεία σε οκτώ διαφορετικές πόλεις στη Βόρεια (Θεσσαλονίκη, Σέρρες, Αλεξανδρούπολη), Δυτική (Ιωάννινα), Κεντρική (Αθήνα, Πειραιάς, Λάρισα) και Νότια (Ηράκλειο) Ελλάδα. Το συνολικό ποσοστό των CRAB στελεχών στα νοσοκομεία αυτά ήταν 95%. Η μελέτη συμπεριέλαβε 194 τυχαία επιλεγμένα, μη επαναλαμβανόμενα CRAB στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών σε αυτά τα νοσοκομεία. Μετά την απομόνωσή τους τα στελέχη υποβλήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για περαιτέρω διερεύνηση. Η επιβεβαίωση του είδους ως *A. baumannii* έγινε με PCR για την ανίχνευση του ενδογενούς γονιδίου *bla*_{OXA-51-like}, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

5.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά

Οι ευαισθησίες των στελεχών σε ένα μεγάλο φάσμα αντιβιοτικών, όπως αμικιλλίνη/σουλπακτάμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, γενταμικίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη, τετρακυκλίνη και τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 και σε λίγα στελέχη με το σύστημα Microscan. Για τα αντιβιοτικά ιμιπενέμη, μεροπενέμη, μινοκυκλίνη

και τιγεκυκλίνη πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των MICs με τη μέθοδο AD, ακολουθώντας τις οδηγίες του CLSI (140). Για την κολιστίνη έγινε προσδιορισμός της MIC με τη μέθοδο BMD (140), όπως συνέστησε πρόσφατα (2016) η EUCAST και το CLSI (323). Τα ερμηνευτικά κριτήρια του CLSI (140) εφαρμόστηκαν για την κατηγοριοποίηση των στελεχών. Για την τιγεκυκλίνη υπολογίστηκαν η MIC₅₀ και η MIC₉₀, λόγω της έλλειψης ερμηνευτικών κριτηρίων από το CLSI και τη EUCAST για τα *Acinetobacter* spp. Τα στελέχη ταξινομήθηκαν ως MDR, XDR και PDR, όπως προτάθηκε από τον Magiorakos *et al.* στο παρελθόν (202).

Επίσης, λόγω των προβημάτων που παρουσιάζει ο έλεγχος ευαισθησίας στην κολιστίνη, αποφασίσαμε να ελέγξουμε περαιτέρω 117 στελέχη *A. baumannii* με τα αυτόματα συστήματα Vitek 2 Compact (VITEK 2 AST XN05 Cards, bioMérieux) και Phoenix100 (Phoenix NMIC/ID-96 Panel, BD), καθώς και με τη μέθοδο AD σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Η μέθοδος BMD χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς για τη σύγκριση των υπόλοιπων μεθόδων. Τα στελέχη με MIC ≤ 2 µg/ml αξιολογήθηκαν ως ευαίσθητα, ενώ αυτά με MIC > 2 µg/ml ως ανθεκτικά.

5.3. Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεµασών και αλληλουχιών εισδοχής

Τα γονίδια που κωδικογραφούν για γνωστές καρβαπενεµάσες τύπου οξακιλλινάσης (*bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like}, *bla*_{OXA-143-like}) και μεταλλο-β-λακταμάσης (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}) (324–326) ελέγχθησαν σε όλα τα στελέχη με multiplex PCR, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ταχεία ανίχνευση διαφορετικών γονιδίων. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση ανιχνεύτηκαν τα ένζυμα τύπου-OXA και στη δεύτερη αντίδραση τα μεταλλο-ένζυμα, χρησιμοποιώντας εκκινητές και συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων ακολούθησε ανάλυση της αλληλουχίας σε επιλεγμένα στελέχη από την εταιρεία Macrogen.

Πίνακας 6. Εκκινητές για την ανίχνευση καρβαπενεμασών με τη multiplex PCR

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51-like-F OXA-51-like-R	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	95°C 2 min 95°C 20 sec 52°C 20 sec 72°C 30 sec 72°C 5 min	(324)
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23-like-F OXA-23-like-R	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	*30	(324)
<i>bla</i> _{OXA-40-like}	OXA-40-like-F OXA-40-like-R	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246		(324)
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58-like-F OXA-58-like-R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCCTGCGCTCTACATAC	599		(324)
<i>bla</i> _{OXA-143}	OXA-143-F OXA-143-R	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGGCCAACC	149		(325)
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	95°C 2 min 95°C 20 sec 52°C 20 sec 72°C 30 sec 72°C 5 min	(326)
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F VIM-R	GATGGTGTGTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390	*30	(326)
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621		(326)

Αλληλουχίες εισδοχής που σχετίζονται με τις οξακιλλινάσες στο *A. baumannii* μελετήθηκαν με PCR. Αναλυτικότερα, έγινε έλεγχος της παρουσίας *ISAbal* στην ανωφέρεια των οξακιλλινασών χρησιμοποιώντας τον forward εκκινητή για το στοιχείο εισδοχής *ISAbal*-F (CACGAATGCAGAAGTTG) με τον reverse εκκινητή για το γονίδιο που κωδικογραφεί για την καθεμία από τις καρβαπενεμάσες *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} και *bla*_{OXA-23-like} (247, 327). Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στις PCRs για τους συνδυασμούς του εκκινητή *ISAbal*-F με τους reverse εκκινητές των γονιδίων *bla*_{OXA-51-like} και *bla*_{OXA-58-like} ήταν αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 2 min και ακολούθησαν 30 κύκλοι επαναλήψεων που περιελάμβαναν: αποδιάταξη στους 95°C για 20 sec, υβριδισμό των εκκινητών στους 58°C για 20 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Ακολούθησε το τελικό στάδιο της επιμήκυνσης στους 72°C για 5 min. Στην PCR για τον συνδυασμό του εκκινητή *ISAbal*-F με τον reverse εκκινητή του γονιδίου *bla*_{OXA-23-like} χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες με τη διαφορά ότι ο υβριδισμός των εκκινητών έγινε στους 56°C.

5.4. Μοριακή τυποποίηση

- Μέθοδος των 2 multiplex PCRs

Οι δύο multiplex PCRs που ενισχύουν επιλεκτικά τα αλληλικά της ομάδας 1 (group 1) ή της ομάδας 2 (group 2) των γονιδίων *ompA*, *csuE* και *bla*_{OXA-51-like} χρησιμοποιήθηκαν ως μέθοδος διαλογής για τον ταχύ διαχωρισμό των στελεχών στις ομάδες (sequence groups, G_S) 1-3 και 6, όπως περιγράφηκε προηγουμένως στη βιβλιογραφία (120, 122). Στον Πίνακα 7 περιγράφονται οι εκκινητές και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο των multiplex PCRs.

Πίνακας 7 . Εκκινητές για την τυποποίηση με 2 multiplex PCRs

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Συνθήκες PCR
1η multiplex PCR				
<i>ompA</i>	Group1ompAF306	GATGGCGTAAATCGTGGTA	355	95°C 2 min
	Group1and2ompAR660	CAACTTTAGCGATTTCTGG		95°C 20 sec
<i>csuE</i>	Group1csuEF	CTTTAGCAAACATGACCTACC	702	57°C 20 sec
	Group1csuER	TACACCCGGGTTAATCGT		72°C 30 sec
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	Gp1OXA66F89	GCGCTTCAAAATCTGATGTA	559	72°C 5 min
	Gp1OXA66R647	GCGTATATTTTGTTCATTC		
2η multiplex PCR				
<i>ompA</i>	Group2ompAF378	GACCTTTCTTATCACAACGA	343	95°C 2 min
	Group1and2ompAR660	CAACTTTAGCGATTTCTGG		95°C 20 sec
<i>csuE</i>	Group2csuEF	GGCGAACATGACCTATTT	580	57°C 20 sec
	Group2csuER	CTTCATGGCTCGTTGGTT		72°C 30 sec
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	Gp2OXA69F169	CATCAAGGTCAAACCTCAA	162	72°C 5 min
	Gp2OXA69R330	TAGCCTTTTTTCCCCATC		

- Μέθοδος αλληλούχισης ενός γενετικού τόπου (*bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing, SBT)

Ακολούθησε τυποποίηση όλων των στελεχών με τη μέθοδο αλληλούχισης SBT, η οποία ταξινομεί τα στελέχη σε διεθνείς κλώνους ICs (119). Πρόκειται για εύκολη και γρήγορη μέθοδο που βασίζεται στον πολλαπλασιασμό με PCR και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της χρωμοσωμικά εδραζόμενης οξακιλλινάσης *bla*_{OXA-51-like}, η οποία παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Οι εκκινητές, καθώς και οι συνθήκες της PCR έχουν ήδη αναφερθεί στον Πίνακα 2. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR χρησιμοποιώντας το Purelink PCR Purification Kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε προηγουμένως και προσδιορισμός της αλληλουχίας όλων των προϊόντων από την εταιρεία MacroGen. Οι αλληλουχία του κάθε γονιδίου (από το 79ο έως το 771ο νουκλεοτίδιο) υποβλήθηκε στη βάση δεδομένων του Health Protection Agency (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php>) και καθορίστηκε ο τύπος της οξακιλλινάσης και κατ' επέκταση ο διεθνής κλώνος IC στον οποίο ανήκε το κάθε στέλεχος.

- Μέθοδος MLST με το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur

Στη συνέχεια, επιλέγησαν 31 στελέχη από όλα τα νοσοκομεία, έτσι ώστε να εκπροσωπούν όλα τα Gs και τους συνδυασμούς των αλληλίων που καθορίστηκαν από τις multiplex PCRs και τους διεθνείς κλώνους που προέκυψαν από τη μέθοδο SBT. Τα επιλεγμένα στελέχη υποβλήθηκαν σε μοριακή τυποποίηση με MLST σύμφωνα με το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε προηγουμένως.

- Μέθοδος PFGE

Έπειτα, ακολούθησε η τυποποίηση των 31 στελεχών με PFGE μετά από μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* σύμφωνα με το ως άνω περιγραφέν πρωτόκολλο και η δημιουργία του δένδρογράμματος. Αναλυτικότερα, τα λαμβανόμενα πρότυπα PFGE μετατράπηκαν σε αρχεία TIFF και υποβλήθηκαν σε ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) με τη χρήση του προγράμματος GelCompar II v. 4.6 software package (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Για την ανάλυση των ομοιοτήτων των γενετικών αποτυπωμάτων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Dice και η ομαδοποίηση βασίστηκε στη μέθοδο UPGMA (un-weighted pair-group method with arithmetic averages). Για την ερμηνεία των γενετικών αποτυπωμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια του Tenover *et al.* και η ανάλυση του δένδρογράμματος. Εν συντομία, τα στελέχη

που εμφάνισαν περισσότερες από τρεις παραλλαγές θραυσμάτων DNA και ομοιότητα < 85% θεωρήθηκαν ότι αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς τύπους PFGE και άρα δεν έχουν γενετική συγγένεια. Τα στελέχη που παρουσίασαν μία έως τρεις διαφορές θραυσμάτων και ομοιότητα > 85% στην ανάλυση του δενδρογράμματος θεωρήθηκαν ότι ανήκουν σε διαφορετικούς υποτύπους του ίδιου τύπου PFGE κι επομένως έχουν γενετική συγγένεια.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη

1.1. Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών

Τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη (MICs >32 µg/ml). Από τον μοριακό έλεγχο προέκυψε ότι το 55% των στελεχών ($n=11$) έφερε *bla*_{OXA-23-like} και το 45% ($n=9$) *bla*_{OXA-58-like} καρβαπενεμάση.

1.2. Ευαισθησία στην κολιστίνη, EA, CA, ME και VME χρησιμοποιώντας την BMD ως μέθοδο αναφοράς

Η ευαισθησία/αντοχή των στελεχών της μελέτης στην κολιστίνη, η MIC₅₀ και η MIC₉₀ που προέκυψαν με την κάθε μέθοδο παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Οι MICs στην κολιστίνη που παρήχθησαν με την κάθε μέθοδο παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Η EA, η CA και οι τύποι των σφαλμάτων (VME, ME) που παρήχθησαν από τη σύγκριση των μεθόδων ευαισθησίας στην κολιστίνη χρησιμοποιώντας την BMD ως μέθοδο αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο BMD 18 στελέχη (90%) ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη. Μια τάση προς χαμηλότερες MICs σημειώθηκε για τη μέθοδο BMD-P80, καθώς σημαντικά λιγότερα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη (12 στελέχη, 60%). Η CA μεταξύ των μεθόδων BMD-P80 και BMD ήταν 70%. Η μέθοδος AD απέδωσε παρόμοια αποτελέσματα ευαισθησίας με την BMD και σχετικά καλή CA (80%).

Πίνακας 8. Ευαισθησία των στελεχών *A. baumannii* στην κολιστίνη και MIC₅₀/MIC₉₀ με την κάθε μέθοδο

Μέθοδος	No. (%) των στελεχών		MIC (μg/ml)	
	Ευαίσθητα	Ανθεκτικά	50%	90%
BMD	2 (10)	18 (90)	4	32
BMD-P80	8 (40)	12 (60)	4	16
AD	2 (10)	18 (90)	8	128
Etest	9 (45)	11 (55)	4	8
MTS	7 (35)	13 (65)	4	8
Vitek 2	0 (0)	20 (100)	4	≥16

Πίνακας 9. MICs των στελεχών *A. baumannii* στην κολιστίνη

Μέθοδος	MICs (μg/ml)										Γεωμετρικός μέσος
	≤0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	
BMD	0	0	2	8	6	1	1	1	1	0	7,5
BMD-P80	0	1	7	5	4	2	0	0	1	0	4,6
AD	0	1	1	4	3	2	6	0	2	1	14,9
Etest	6	0	3	6	4	1	0	0	0	0	2,1
MTS	0	0	7	9	2	1	1	0	0	0	4,0
Vitek 2	0	0	0	11	5	4	0	0	0	0	6,7

Ασύμφωνα ποσοστά ευαισθησίας με σοβαρά ερμηνευτικά σφάλματα και μη αποδεκτές CA παρατηρήθηκαν για τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης κολιστίνης Etest και MTS (65 και 75%, αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, η *in vitro* δραστηριότητα της κολιστίνης βρέθηκε να είναι σημαντικά υψηλότερη με το Etest και μόνο το 55% των στελεχών χαρακτηρίστηκαν ως

ανθεκτικά. Παρομοίως, το 65% των στελεχών ταξινομήθηκαν ως ανθεκτικά με το MTS. Το Vitek 2 κατηγοριοποίησε το 100% των στελεχών ως ανθεκτικά, δείχνοντας εξαιρετική CA με τη μέθοδο BMD (90%).

Πίνακας 10. EA, CA και τα είδη των σφαλμάτων που παρήχθησαν όταν ο έλεγχος ευαισθησίας στην κολιστίνη με τις μεθόδους BMD-P80, AD, Etest, MTS και Vitek 2 συγκρίθηκε με τη μέθοδο BMD

Μέθοδος	No. (%) των στελεχών			
	EA	CA	VME	ME
BMD-P80	19 (95)	14 (70)	6 (30)	0 (0)
AD	11 (55)	16 (80)	2 (10)	2 (10)
Etest	11 (55)	13 (65)	7 (35)	0 (0)
MTS	18 (90)	15 (75)	5 (25)	0 (0)
Vitek 2	17 (85)	18 (90)	0 (0)	2 (10)

Μεταξύ των μεθόδων την υψηλότερη EA εμφάνισε η BMD-P80 με ποσοστό 95%, το οποίο υπερβαίνει το αποδεκτό όριο απόδοσης για τις μεθόδους ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά. Ειδικότερα, με τη μέθοδο BMD-P80 το 35% των στελεχών επέδειξε πανομοιότυπες MICs με αυτές της μεθόδου BMD, ενώ το 60% των στελεχών εμφάνισαν MICs οι οποίες ήταν μία αραιώση χαμηλότερες. Η μέθοδος AD παρουσίασε χαμηλό ποσοστό EA (55%) και τάση προς υψηλότερες MICs στην κολιστίνη: πιο συγκεκριμένα παρήγαγε υψηλότερες MICs από τη μέθοδο BMD κατά 1, 2 και 3 αραιώσεις στο 30%, 35% και 5% των στελεχών, αντίστοιχα. Σε αντίθεση, το Etest παρήγαγε MICs χαμηλότερες από τη μέθοδο BMD κατά 1, 2, 3 και >3 αραιώσεις για το 30%, 5%, 25% και 15% των στελεχών, αντίστοιχα, εμφανίζοντας χαμηλό ποσοστό EA (55%). Παρομοίως, οι MICs που προέκυψαν με το MTS ήταν 1, 3 και >3 αραιώσεις χαμηλότερες από εκείνες της BMD για το 55%, 5% και 5% των στελεχών, αντίστοιχα, ενώ η μέθοδος παρουσίασε πολύ καλή EA (90%). Για το Vitek 2, το ποσοστό EA ήταν 85%: το 40% των στελεχών είχαν ίσες MICs με εκείνες που

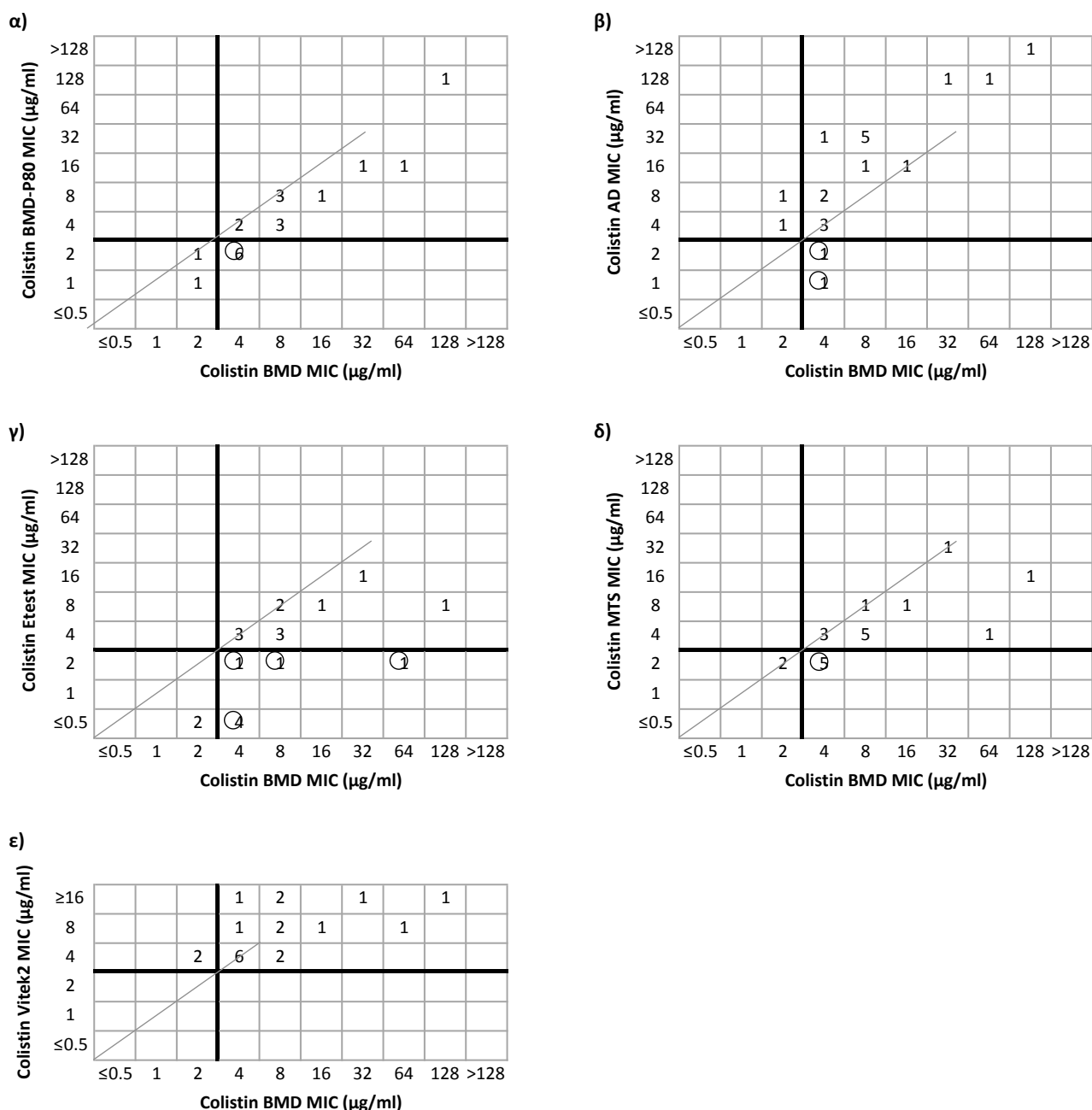
ελήφθησαν με τη μέθοδο BMD, ενώ το 45% των στελεχών είχαν υψηλότερη ή χαμηλότερη MIC κατά μία αραιώση (Πίνακας 11).

Από την άποψη των μεθοδολογικών σφαλμάτων (Πίνακας 10, Γράφημα 1), η μέθοδος BMD-P80 απέδωσε υψηλά ποσοστά VMEs (30%) δίχως MEs, ενώ η μέθοδος AD εμφάνισε 10% VMEs και 10% MEs. Το Etest απέδωσε το υψηλότερο ποσοστό VMEs (35%), ενώ δεν εμφάνισε MEs. Το MTS παρήγαγε επίσης υψηλά ποσοστά VMEs (25%), χωρίς MEs. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν VMEs για το Vitek 2, ενώ απέδωσε 10% MEs.

Συμπερασματικά, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής ανέδειξε σημαντικά προβλήματα στον έλεγχο της ευαισθησίας της κολιστίνης. Καθώς η κολιστίνη είναι από τα ελάχιστα αντιβιοτικά που παραμένουν δραστικά έναντι του *A. baumannii*, οι παρατηρήσεις της μελέτης κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικές για την κλινική πράξη.

Πίνακας 11. Διαφορές που παρατηρήθηκαν στις υποδιπλάσιες αραιώσεις των MICs με τις μεθόδους BMD-P80, AD, Etest, MTS και Vitek 2 σε σύγκριση με τη μέθοδο BMD

Μέθοδος	No. (%) των στελεχών με διαφορά στην MIC (σε log2 αραιώσεις):							
	>-3	-3	-2	-1	0	1	2	3
BMD-P80			1 (5)	12 (60)	7 (35)			
AD			1 (5)	1 (5)	4 (20)	6 (30)	7 (35)	1 (5)
Etest	3 (15)	5 (25)	1 (5)	6 (30)	5 (25)			
MTS	1 (5)	1 (5)		11 (55)	7 (35)			
Vitek 2		2 (10)		4 (20)	8 (40)	5 (25)	1 (5)	



Γράφημα 1. Διαγράμματα διασποράς που δείχνουν τον αριθμό των στελεχών ($n=20$) με τις MICs στην κολιστίνη που προέκυψαν από τις μεθόδους **(α)** BMD-P80, **(β)** AD, **(γ)** Etest, **(δ)** MTS, **(ε)** Vitek 2 έναντι της BMD ως μεθόδου αναφοράς. Οι μαύρες συμπαγείς γραμμές αντιπροσωπεύουν το όριο ευαισθησίας (≤ 2 $\mu\text{g/ml}$). Η διαγώνιος γραμμή δείχνει απόλυτη συμφωνία. Τα πολύ σημαντικά σφάλματα (VMEs) υποδεικνύονται με κύκλους.

2. Φαινοτυπική και μοριακή μελέτη και διερεύνηση της λοιμογόνου δύναμης κλινικών στελεχών *A. baumannii* ανθεκτικών στην κολιστίνη

2.1. Πρώτο ζεύγος ColS/ColR στελεχών *A. baumannii*

Γυναίκα ηλικίας 61 ετών προσήλθε στο νοσοκομείο τον Οκτώβριο του 2008 με αναπνευστική ανεπάρκεια, οφειλόμενη σε σοβαρό νευρολογικό σύνδρομο. Η ασθενής μεταφέρθηκε στη ΜΕΘ, όπου υποβλήθηκε σε τραχειοστομία και μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, ενώ παράλληλα ξεκίνησε εμπειρική αγωγή με αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη. Οι καλλιέργειες αίματος, ούρων και βρογχικών εκκρίσεων δεν ανέδειξαν την ανάπτυξη παθογόνου μικροοργανισμού. Τη 17η ημέρα της νοσηλείας απομονώθηκε από τις βρογχικές εκκρίσεις της ασθενούς *A. baumannii* (Ab299), το οποίο σύμφωνα με το αντιβιογράμμα ήταν ανθεκτικό στα περισσότερα αντιβιοτικά και ευαίσθητο στην κολιστίνη (MIC 0.5 µg/ml). Κατά τη διάρκεια των επόμενων 100 ημερών, 14 στελέχη *A. baumannii* με τον ίδιο φαινότυπο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά απομονώθηκαν διαδοχικά από τις βρογχικές εκκρίσεις της ασθενούς, καθώς και 5 στελέχη *A. baumannii* από καλλιέργειες αίματος. Κατά την περίοδο αυτή η ασθενής παρουσίασε επαναλαμβανόμενα επεισόδια μικροβαιμίας οφειλόμενα σε *A. baumannii* και *Burkholderia cepacia*, για τα οποία της χορηγήθηκε θεραπεία με πολλαπλά σχήματα αντιβιοτικών (μεταξύ των οποίων αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, γενταμικίνη, τιγκεκυκλίνη, σιπροφλοξασίνη και μεροπενέμη για περισσότερες από 10 ημέρες το καθένα) και επίσης κολιστίνη για 28 ημέρες συνολικά. Την 122η ημέρα της νοσηλείας, κι ενώ η ασθενής δεν παρουσίαζε κλινικά σημεία λοίμωξης του αναπνευστικού, απομονώθηκε από την καλλιέργεια βρογχικών εκκρίσεων *A. baumannii* ανθεκτικό στην κολιστίνη (Ab347, MIC 32 µg/ml). Μέχρι τη 206η ημέρα απομονώθηκαν συνολικά δώδεκα ColR στελέχη *A. baumannii* από διαδοχικές καλλιέργειες βρογχικών εκκρίσεων, τα οποία ήταν φαινοτυπικά όμοια με το στέλεχος Ab347. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ColS στέλεχος *A. baumannii*, φαινοτυπικά όμοιο με το Ab299, αποτέλεσε αίτιο μικροβαιμίας τη 212η ημέρα, ενώ δεν απομονώθηκε κανένα ColR στέλεχος από αιμοκαλλιέργειες κατά τη διάρκεια ολόκληρης της νοσηλείας. Η ασθενής πήρε εξιτήριο τη 224η ημέρα σε καλή κλινική κατάσταση.

2.2. Δεύτερο ζεύγος ColS/ColR στελεχών *A. baumannii*

Άντρας ηλικίας 77 ετών με προηγηθείσα θωρακοτομή εισήχθηκε στο νοσοκομείο τον Ιούλιο του 2008, εξαιτίας διαπύσης του χειρουργικού τραύματος και μεσοθωρακίτιδας. Ο ασθενής μεταφέρθηκε στη ΜΕΘ και λήφθηκαν καλλιέργειες από την περιοχή του χειρουργικού τραύματος, οι οποίες δεν ανέδειξαν την παρουσία παθογόνου μικροοργανισμού. Ακολούθησε χειρουργικός καθαρισμός της στερνοτομής και χορηγήθηκε εμπειρική αγωγή με ιμιπενέμη, τεϊκοπλανίνη και μετρονιδαζόλη. Τη 14η ημέρα της νοσηλείας απομονώθηκε από καλλιέργεια πύου της στερνοτομής ColS *A. baumannii* (Ab248, MIC 0.5 µg/ml), το οποίο ήταν ανθεκτικό στις καρβαπενέμες: η προηγούμενη εμπειρική θεραπεία διακόπηκε και ξεκίνησε αγωγή με κολιστίνη και τιγκεκυκλίνη. Την 37η ημέρα της νοσηλείας, κι ενώ η εικόνα του τραύματος ήταν βελτιωμένη, η καλλιέργεια πύου ανέδειξε ColR στέλεχος *A. baumannii* (Ab249, MIC 128 µg/ml). Παρόλο που τις επόμενες ημέρες της νοσηλείας απομονώθηκαν διαδοχικά τρία ακόμη ColR στελέχη *A. baumannii*, φαινοτυπικά όμοια με το Ab249, ο ασθενής δεν έλαβε αντιμικροβιακή αγωγή λόγω της απουσίας κλινικών σημείων λοίμωξης και εξήχθηκε την 65η ημέρα.

2.3. Χαρακτηριστικά των στελεχών

Τα χαρακτηριστικά των οκτώ ColR στελεχών που μελετήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 12. Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στα περισσότερα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών (MICs ≥ 32 µg/ml για ιμιπενέμη και μεροπενέμη), εκτός της τιγκεκυκλίνης. Οι MICs στην κολιστίνη με τη μέθοδο μακροαραιώσεων σε ζωμό κυμαίνονταν από 8 έως >256 µg/ml.

Τα χαρακτηριστικά των στελεχών των δύο ζευγαριών που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 13. Και τα δύο ζευγάρια των στελεχών ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (MICs >32 µg/ml για ιμιπενέμη και μεροπενέμη), καθώς επίσης ανθεκτικά στα περισσότερα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν, εκτός της τιγκεκυκλίνης και της αμπικιλλίνης/σουλμπακτάμης. Η ριφαμπικίνη παρουσίασε χαμηλές MICs. Όσον αφορά στην κολιστίνη, η MIC ήταν 0.5 µg/ml για τα ColS στελέχη Ab248 και Ab299, ενώ ήταν 128 µg/ml και 32 µg/ml για τα ColR στελέχη Ab249 και Ab347, αντίστοιχα.

Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά των 8 ColR στελεχών *A. baumannii*

Αμινοξικές αλλαγές						
Στελέχη	Απομόνωση (έτος)	Υλικό	Colistin MIC (μg/ml)	OXA-γονίδια	Τύπος PFGE	ST
Ab1	2008	Αίμα	32	OXA-66 OXA-58	Ic	2
Ab2	2008	Τρρώμα	>256	OXA-66 OXA-58	Ib	2
Ab3	2008	Βρογχικές εκκρίσεις	64	OXA-66 OXA-58	Ic	2
Ab4	2008	ΚΦΚ ^a	32	OXA-66 OXA-58	Ic	2
Ab5	2009	Πρώμα	32	OXA-66 OXA-58	Ic	2
Ab6	2010	Τρρώμα	32/R	OXA-66 OXA-58	Id	2
Ab7	2011	Βρογχικές εκκρίσεις	32	OXA-69 OXA-58	II	1
Ab8	2012	Αίμα	8	OXA-66 OXA-23	IV	645 ^β

α: κεντρικός φλεβικός καθετήρας

β: νέος ST τύπος

γ: μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν στη βιβλιογραφία (Αττογο *et al*, 2011)

*: αμινοξικές αλλαγές επιβεβαιώθηκαν σύμφωνα με το πρόγραμμα SIFT

Πίνακας 13. Χαρακτηριστικά των ζευγών των ColS/ColR στελεχών *A. baumannii*

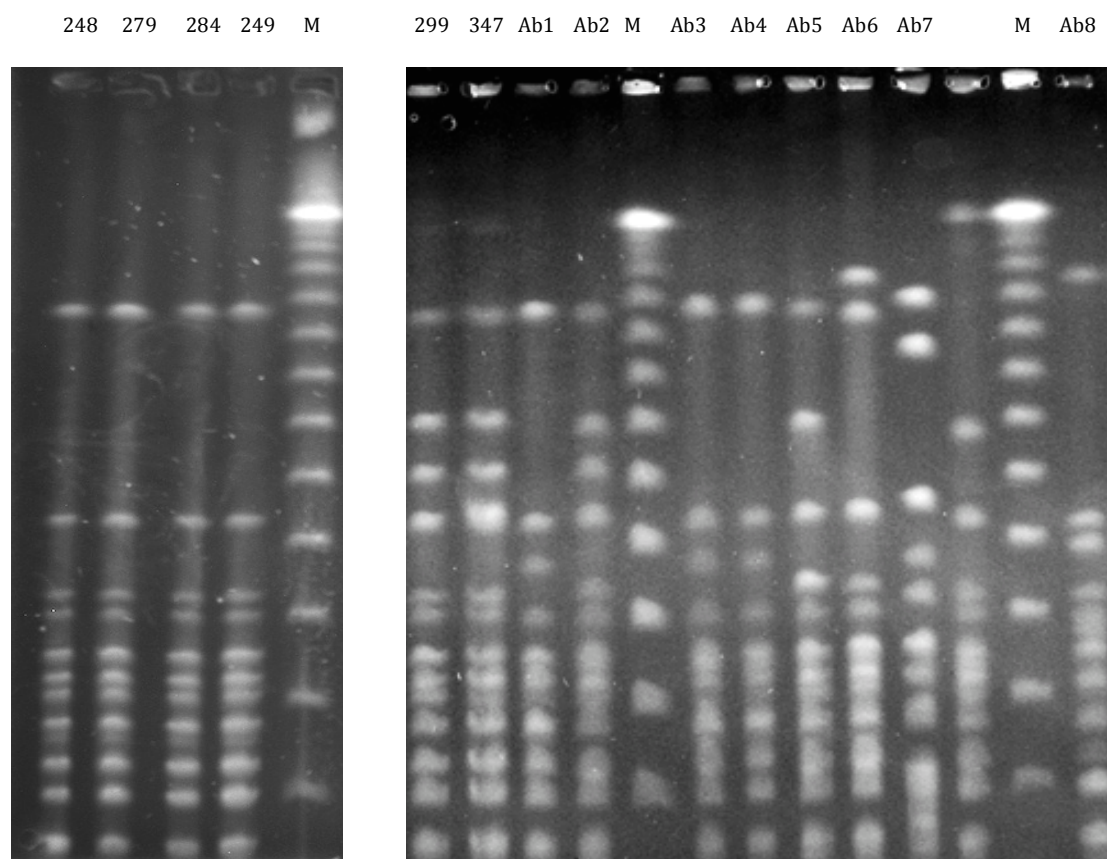
Στελέχη	Απομόνωση (ημέρα νοσηλείας)	Υλικό	Colistin MIC (μg/ml) / Προφίλ ευαισθησίας	Γονίδια <i>bla</i> _{OXA}	Τύπος PFGE	ST	Γονότυπος <i>pmrB</i>
Ab248	14 ^η	Πύο	0.5/E	<i>bla</i> _{OXA-66} <i>bla</i> _{OXA-58}	Ia	2	Αγρίου τύπου
Ab249	37 ^η	Πύο	128/A	<i>bla</i> _{OXA-66} <i>bla</i> _{OXA-58}	Ia	2	P233S
Ab299	17 ^η	Βρογχικές εκκρίσεις	0.5/E	<i>bla</i> _{OXA-66} <i>bla</i> _{OXA-58}	Ib	2	Αγρίου τύπου
Ab347	122 ^η	Βρογχικές εκκρίσεις	32/A	<i>bla</i> _{OXA-66} <i>bla</i> _{OXA-58}	Ib	2	P170L

E: Ευαίσθητο, A: Ανθεκτικό

2.4. Μέθοδοι τυποποίησης

Η μέθοδος PFGE ανέδειξε την παρουσία 3 τύπων [τύποι PFGE I (με 4 υποτύπους Ib-Ie), II, IV)] στα οκτώ ColR στελέχη (Εικόνα 1). Όσον αφορά στα δύο ζευγάρια, όλα τα ColS/ColR κλινικά στελέχη εντός του κάθε ζεύγους εμφάνισαν ακριβώς όμοια ηλεκτροφορητική εικόνα, ανήκαν δηλαδή σε πανομοιότυπο PFGE τύπο. Τα στελέχη του πρώτου ζεύγους διέφεραν από τα στελέχη του δεύτερου ζεύγους ως προς δύο ηλεκτροφορητικές ζώνες κι επομένως θεωρήθηκε ότι ανήκουν σε διαφορετικούς υποτύπους του ίδιου κλώνου (Εικόνα 1).

Η τυποποίηση με το σχήμα MLST ανέδειξε ότι τα έξι από τα οκτώ ColR στελέχη (Ab1-Ab6) και τα ColS/ColR στελέχη των δύο ζευγαριών ανήκαν στον τύπο ST2 (αλληλικό προφίλ: 2-2-2-2-2-2). Ο τύπος ST2 ανήκει στον διεθνή κλώνο CC2, ο οποίος είναι και ο επικρατέστερος στις περισσότερες περιοχές παγκοσμίως (101,224).



Εικόνα 1. Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των στελεχών της μελέτης.

M: lambda-phage molecular size marker

248-279: ColS στελέχη του 2^{ου} ασθενούς, υπότυπος Ia

284-249: ColR στελέχη του 2^{ου} ασθενούς, υπότυπος Ia

299-347: ColS-ColR στελέχη της 1^{ης} ασθενούς, υπότυπος Ib

Ab1, Ab3, Ab4: ColR στελέχη, υπότυπος Ie

Ab2: ColR στέλεχος, υπότυπος Ib

Ab5: ColR στέλεχος, υπότυπος Ic

Ab6: ColR στέλεχος, υπότυπος Id

Ab7: ColR στέλεχος, τύπος II

Ab8: ColR στέλεχος, τύπος IV

Το ColR στέλεχος Ab8 ανήκε στον νέο τύπο ST645 (αλληλικό προφίλ: 2-103-2-2-2-2-2). Πρόκειται για τύπο, ο οποίος αποτελεί SLV του τύπου ST2, δηλαδή υπάρχει διαφορά σε ένα μόνο αλληλικό γονιδίου από τα 7 που εξετάστηκαν. Στην προκειμένη περίπτωση ανιχνεύτηκε η αντικατάσταση 192 G>A στο γονίδιο *fusA* και έτσι προέκυψε μια παραλλαγή του αλληλίου 2, το αλληλικό 103. Τέλος, το ColR στέλεχος Ab7 ανήκε στον τύπο ST1 (αλληλικό προφίλ: 1-1-1-1-5-1-1), ο οποίος περιλαμβάνεται στον διεθνή κλώνο CC1.

2.5. PCR και αλληλούχιση

Ο έλεγχος με PCR για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικογραφούν β-λακταμάσες ανέδειξε την παρουσία του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} σε όλα τα στελέχη. Η καρβαπενεμάση *bla*_{OXA-58-like} ανιχνεύτηκε στα επτά από τα οκτώ ColR στελέχη και στα ColS/ColR στελέχη των ζευγαριών, ενώ στο στέλεχος Ab8 ανιχνεύτηκε η οξακιλλινάση *bla*_{OXA-23-like}. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκάλυψε ότι όλα τα στελέχη, εκτός από το Ab7, έφεραν τα αλληλόμορφα που κωδικογραφούν την οξακιλλινάση *bla*_{OXA-66} και επιβεβαίωσε την προαναφερθείσα ανίχνευση των καρβαπενεμασών *bla*_{OXA-58} και *bla*_{OXA-23}.

Όσον αφορά στα γονίδια που σχετίζονται με την αντοχή στην κολιστίνη, κανένα στέλεχος δεν είχε μεταλλάξεις στα γονίδια *lpxA*, *lpxC* και *lpxD*. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι η σύγκριση των αλληλουχιών των ColR στελεχών Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6 και Ab8 έγινε με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των ColS στελεχών Ab299 και Ab248 και με τις αλληλουχίες της GeneBank για το *A. baumannii* ACICU (National Research Centre, Italy). Οι αλληλουχίες του στελέχους Ab7, που ανήκε στον ST τύπο 1, συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες της GeneBank για το *A. baumannii* AYE (Genoscope, France), που ανήκει επίσης στον ίδιο ST τύπο. Τέλος, οι αλληλουχίες των ColR στελεχών Ab347 και Ab249 συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες των ομολόγων τους ColS στελεχών Ab299 και Ab248, αντίστοιχα. Η υποθετική λειτουργική επίδραση των nonsynonymous μεταλλάξεων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SIFT (328). Πρόκειται για ένα εργαλείο λογισμικού που μπορεί να διακρίνει αν μια αλλαγή ενός αμινοξέος επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης, αν δηλαδή η αλλαγή είναι ουδέτερη ή επιβλαβής (<http://sift.jcvi.org/>).

Οι αμινοξικές αλλαγές των οκτώ ColR στελεχών στα γονίδια *pmrCAB* παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Σε σύγκριση με το ColS στέλεχος Ab299, το ColR στέλεχος Ab347 είχε μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο *pmrB* που οδήγησε σε αλλαγή ενός αμινοξέος, P170L, στην πρωτεΐνη PmrB, η οποία εμπλέκεται στην αντοχή της κολιστίνης μέσω τροποποιήσεων του λιποπολυσακχαρίτη (329). Ομοίως, το ColR στέλεχος Ab249 είχε την αντικατάσταση P233S στην πρωτεΐνη PmrB σε σύγκριση με το ColS ομόλογό του Ab248. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των *pmrB* γονιδίων (1335 bp) των δύο ζευγών παρατίθενται αμέσως παρακάτω.

Ab248-*pmrB*

GTGCATTATTCATTAAAAAAACGACTGATTTGGGGCACCTCAATTTTCAGTGTCTCCTTAGGTTGT
ATTTTAATTTTATAGTGCTTATAAGGTTGCACTTCAAGAAGTCGATGAAATTCTAGATACTCAAATG
AAGTATTTAGCGGAAAGAAGACAGCTGAGCACCTTTAAAAACTGTAAGCAGTAAGTTTGATTTTCAT
AAAACTTACCACGAAGAAGATCTGTTTATCGATATCTGGGCTTATAAGGATCAGGCCCATTTGTCT
CATCATTTACATTTGCTGGTTCCACCTGTTGAGCAAGCGGGATTTTATTCTCATAAAAACCGCTCAAG
GTATAGTCAGAACTTATGTTTTACCTTTGAAGGATTATCAGATTTCAGGTCAGTCAGCAAGAGAGGG
TTCGTGAAGCTTTCGCTTGGGAGCTTGCGGGCAGTATGTTTATTCCGTATTTAATTATTTTACCTTTT
GCAATATTTGCCTTAGCAGCCATTATTCGTCGTGGTTTAAAACCAATAGATGATTTTAAAAATGAG
TTAAAAGAACGCGATTCCGAAGAAGCTCACACCAATTGAAGTACATGATTATCCTCAAGAGCTTTTA
CCTACTATTGACGAAATGAACCGTCTTTTGTAGCGCATTTCTAAAGCGCAAAATGAACAGAAGCA
ATTTATTGCCGATGCTGCTCATGAATTACGAACA**C**CTGTGACTGCATTGAACTTACAAACCAAGAT
TTTGCTAAGCCAGTTTCTGAGCATGAATCATTGCAAACTTAAGCAAGGGTTTGGCGCGTATTCA
GCATTTGGTGACTCAGCTTTTAGCATTGGCAAAGCAAGATGTAACCTTAAAGTATGGTCGAGCCTAC
TGGTTATTTTCAACTCAATGATGTGGCATTAAATTGTGTGGAGCAGTTGGTCAACTTGGCTATGCA
AAAAGAAATCGATTTAGGTTTTGTTAGAAATGAACCCATCGAAATGCATAGTATTGAACCTACTGT
ACATTCGATTATTTTAATTTAATTGATAATGCAATTAAGTACACCCCGCATCAGGGTGTTATTAAT
ATTTTCAGTTTATACCGATCCAGATCACTACGCATGTATTCAAATTGAAGATAGCGGTGCAGGAATA
GACCCTGAAAATTACGATAAAGTCCTTAAGCGTTTTTATCGCGTGCATCACCATCTTGAGGTGGGA
AGTGGTCTAGGTTTATCTATTGTAGATCGTGCAACTCAAAGGCTTGGTGGGACTTTAACTCTCGAT
AAGAGCTTAGAGCTTGGCGGTCTTCTGTATTAGTGAAATTACCTAAAGTTTTACATTTACATGAA
ACAAGAGTGTGA

Ab249-*pmrB*

GTGCATTATTCATTAAAAAAACGACTGATTTGGGGCACCTCAATTTTCAGTGTCTCCTTAGGTTGT
ATTTTAATTTTATAGTGCTTATAAGGTTGCACTTCAAGAAGTCGATGAAATTCTAGATACTCAAATG
AAGTATTTAGCGGAAAGAAGACAGCTGAGCACCTTTAAAAACTGTAAGCAGTAAGTTTGATTTTCAT
AAAACTTACCACGAAGAAGATCTGTTTATCGATATCTGGGCTTATAAGGATCAGGCCCATTTGTCT
CATCATTTACATTTGCTGGTTCCACCTGTTGAGCAAGCGGGATTTTATTCTCATAAAAACCGCTCAAG
GTATAGTCAGAACTTATGTTTTACCTTTGAAGGATTATCAGATTTCAGGTCAGTCAGCAAGAGAGGG
TTCGTGAAGCTTTCGCTTGGGAGCTTGCGGGCAGTATGTTTATTCCGTATTTAATTATTTTACCTTTT
GCAATATTTGCCTTAGCAGCCATTATTCGTCGTGGTTTAAAACCAATAGATGATTTTAAAAATGAG
TTAAAAGAACGCGATTCCGAAGAAGCTCACACCAATTGAAGTACATGATTATCCTCAAGAGCTTTTA
CCTACTATTGACGAAATGAACCGTCTTTTGTAGCGCATTTCTAAAGCGCAAAATGAACAGAAGCA
ATTTATTGCCGATGCTGCTCATGAATTACGAACA**T**CTGTGACTGCATTGAACTTACAAACCAAGAT
TTTGCTAAGCCAGTTTCTGAGCATGAATCATTGCAAACTTAAGCAAGGGTTTGGCGCGTATTCA
GCATTTGGTGACTCAGCTTTTAGCATTGGCAAAGCAAGATGTAACCTTAAAGTATGGTCGAGCCTAC
TGGTTATTTTCAACTCAATGATGTGGCATTAAATTGTGTGGAGCAGTTGGTCAACTTGGCTATGCA
AAAAGAAATCGATTTAGGTTTTGTTAGAAATGAACCCATCGAAATGCATAGTATTGAACCTACTGT
ACATTCGATTATTTTAATTTAATTGATAATGCAATTAAGTACACCCCGCATCAGGGTGTTATTAAT
ATTTTCAGTTTATACCGATCCAGATCACTACGCATGTATTCAAATTGAAGATAGCGGTGCAGGAATA
GACCCTGAAAATTACGATAAAGTCCTTAAGCGTTTTTATCGCGTGCATCACCATCTTGAGGTGGGA
AGTGGTCTAGGTTTATCTATTGTAGATCGTGCAACTCAAAGGCTTGGTGGGACTTTAACTCTCGAT
AAGAGCTTAGAGCTTGGCGGTCTTCTGTATTAGTGAAATTACCTAAAGTTTTACATTTACATGAA
ACAAGAGTGTGA

Η αντικατάσταση που σημειώθηκε στην αλληλουχία του στελέχους Ab249 είναι επισημασμένη με έντονο μαύρο χρώμα. Συγκεκριμένα, στη θέση 697 υπάρχει θυμίνη αντί για κυτοσίνη (697 C>T).

Ab299-*pmrB*

GTGCATTATTCATTAAAAAAACGACTGATTTGGGGCACCTCAATTTTCAGTGTGCATCTTAGGTTGT
ATTTTAATTTTTAGTGCTTATAAGGTTGCACTTCAAGAAGTCGATGAAATTCTAGATACTCAAATG
AAGTATTTAGCGGAAAGAAGACAGCTGAGCACCTTTAAAAACTGTAAGCAGTAAGTTTGATTTTCAT
AAAACTTACCACGAAGAAGATCTGTTTATCGATATCTGGGCTTATAAGGATCAGGCCCATTTGTCT
CATCATTTACATTTGCTGGTTCCACCTGTTGAGCAAGCGGGATTTTATTCTCATAAAACCGCTCAAG
GTATAGTCAGAACTTATGTTTTACCTTTGAAGGATTATCAGATTCAGGTCAGTCAGCAAGAGAGGG
TTCGTGAAGCTTTCGCTTGGGAGCTTGCGGGCAGTATGTTTATTCCGTATTTAATTATTTTACCTTTT
GCAATATTTGCCTTAGCAGCCATTATTCGTCGTGGTTTAAAAACCAATAGATGATTTTAAAAATGAG
TTAAAAGAACGCGATTCCGAAGAAGTACACCAATTGAAGTACATGATTATCCTCAAGAGCTTTTA
CCTACTATTGACGAAATGAACCGTCTTTTTGAGCGCATTTCTAAAGCGCAAAATGAACAGAAGCA
ATTTATTGCCGATGCTGCTCATGAATTACGAACACCTGTGACTGCATTGAACCTACAAACCAAGAT
TTTGCTAAGCCAGTTTCTGAGCATGAATCATTGCAAAACTTAAGCAAGGGTTTGGCGCGTATTCA
GCATTTGGTGACTCAGCTTTTAGCATTGGCAAAGCAAGATGTAACCTTAAAGTATGGTCGAGCCTAC
TGGTTATTTTCAACTCAATGATGTGGCATTAAATTGTGTGGAGCAGTTGGTCAACTTGGCTATGCA
AAAAGAAATCGATTTAGGTTTTGTTAGAAATGAACCCATCGAAATGCATAGTATTGAACCTACTGT
ACATTCGATTATTTTAATTTAATTGATAATGCAATTAAGTACACCCCGCATCAGGGTGTTATTAAT
ATTTTCAGTTTATACCGATCCAGATCACTACGCATGTATTCAAATTGAAGATAGCGGTGCAGGAATA
GACCCTGAAAATTACGATAAAGTCCTTAAGCGTTTTTATCGCGTGCATCACCATCTTGAGGTGGGA
AGTGGTCTAGGTTTATCTATTGTAGATCGTGCAACTCAAAGGCTTGGTGGGACTTTAACTCTCGAT
AAGAGCTTAGAGCTTGGCGGTCTTCTGTATTAGTGAAATTACCTAAAGTTTTACATTTACATGAA
ACAAGAGTGTGA

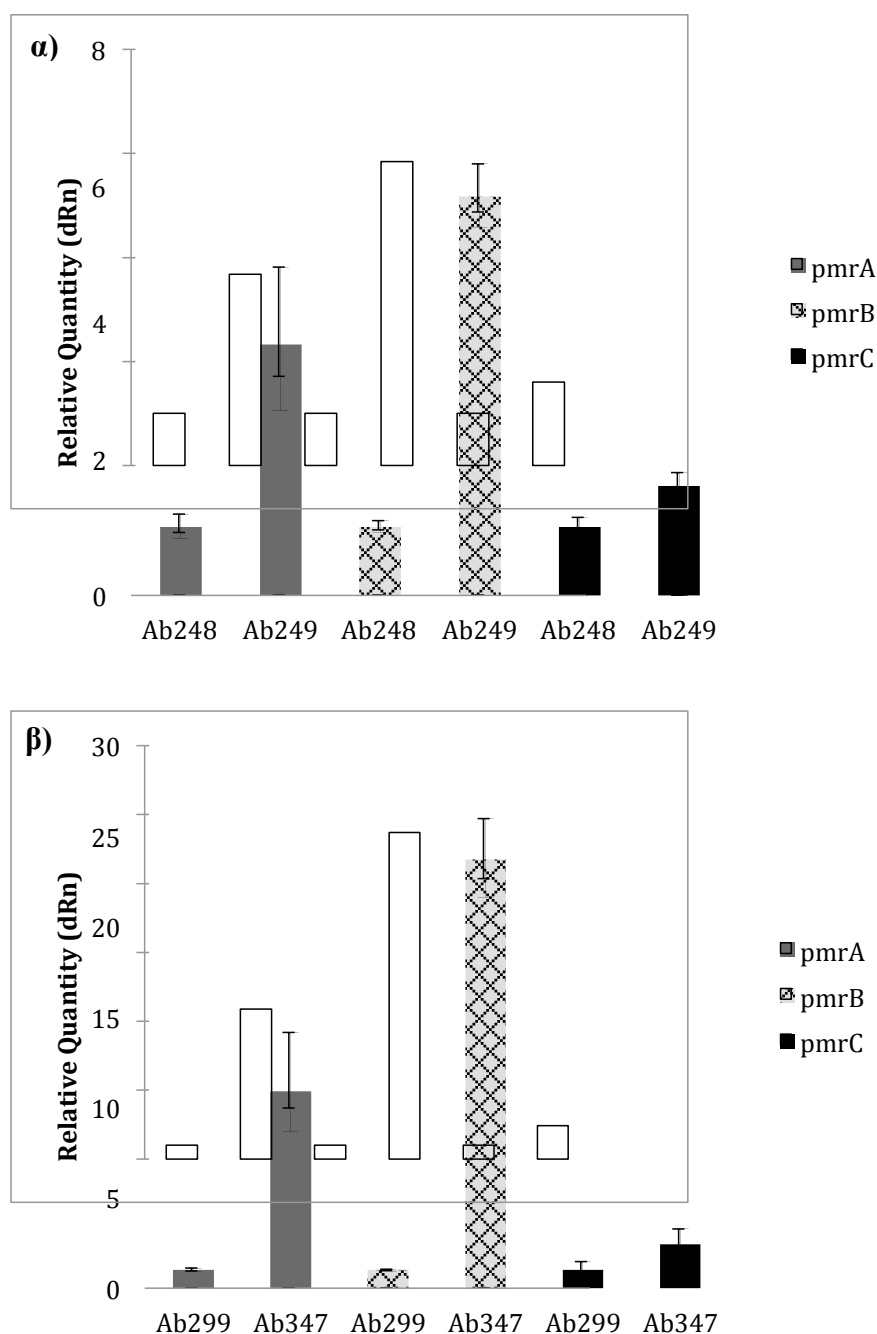
Ab347-*pmrB*

GTGCATTATTCATTAAAAAAACGACTGATTTGGGGCACCTCAATTTTCAGTGTGCATCTTAGGTTGT
ATTTTAATTTTTAGTGCTTATAAGGTTGCACTTCAAGAAGTCGATGAAATTCTAGATACTCAAATG
AAGTATTTAGCGGAAAGAAGACAGCTGAGCACCTTTAAAAACTGTAAGCAGTAAGTTTGATTTTCAT
AAAACTTACCACGAAGAAGATCTGTTTATCGATATCTGGGCTTATAAGGATCAGGCCCATTTGTCT
CATCATTTACATTTGCTGGTTCCACCTGTTGAGCAAGCGGGATTTTATTCTCATAAAACCGCTCAAG
GTATAGTCAGAACTTATGTTTTACCTTTGAAGGATTATCAGATTCAGGTCAGTCAGCAAGAGAGGG
TTCGTGAAGCTTTCGCTTGGGAGCTTGCGGGCAGTATGTTTATTCCGTATTTAATTATTTTACCTTTT
GCAATATTTGCCTTAGCAGCCATTATTCGTCGTGGTTTAAAAACCAATAGATGATTTTAAAAATGAG
TTAAAAGAACGCGATTCCGAAGAAGTACACCAATTGAAGTACATGATTATCCTCAAGAGCTTTTA
CCTACTATTGACGAAATGAACCGTCTTTTTGAGCGCATTTCTAAAGCGCAAAATGAACAGAAGCA
ATTTATTGCCGATGCTGCTCATGAATTACGAACACCTGTGACTGCATTGAACCTACAAACCAAGAT
TTTGCTAAGCCAGTTTCTGAGCATGAATCATTGCAAAACTTAAGCAAGGGTTTGGCGCGTATTCA
GCATTTGGTGACTCAGCTTTTAGCATTGGCAAAGCAAGATGTAACCTTAAAGTATGGTCGAGCCTAC
TGGTTATTTTCAACTCAATGATGTGGCATTAAATTGTGTGGAGCAGTTGGTCAACTTGGCTATGCA
AAAAGAAATCGATTTAGGTTTTGTTAGAAATGAACCCATCGAAATGCATAGTATTGAACCTACTGT
ACATTCGATTATTTTAATTTAATTGATAATGCAATTAAGTACACCCCGCATCAGGGTGTTATTAAT
ATTTTCAGTTTATACCGATCCAGATCACTACGCATGTATTCAAATTGAAGATAGCGGTGCAGGAATA
GACCCTGAAAATTACGATAAAGTCCTTAAGCGTTTTTATCGCGTGCATCACCATCTTGAGGTGGGA
AGTGGTCTAGGTTTATCTATTGTAGATCGTGCAACTCAAAGGCTTGGTGGGACTTTAACTCTCGAT
AAGAGCTTAGAGCTTGGCGGTCTTCTGTATTAGTGAAATTACCTAAAGTTTTACATTTACATGAA
ACAAGAGTGTGA

Ομοίως, η αντικατάσταση που σημειώθηκε στην αλληλουχία του στελέχους Ab347 είναι επισημασμένη με έντονο μαύρο χρώμα. Στη θέση 509 υπάρχει θυμίνη αντί για κυτοσίνη (509 C>T).

2.6. Ποσοτική real-time RT-PCR

Τα ColR στελέχη Ab249 και Ab347 είχαν αυξημένη έκφραση των γονιδίων *pmrA* (3,61- και 10,9-φορές, αντίστοιχα) και *pmrB* (5,73- και 23,7-φορές, αντίστοιχα) σε σύγκριση με εκείνη των ColS ομολόγων τους Ab248 και Ab299, αντιστοίχως, ενώ παρουσίασαν μικρότερη αύξηση στην έκφραση του *pmrC* (1,6- και 2,44-φορές, αντίστοιχα). Η σχετική έκφραση των γονιδίων *pmrCAB* παριστάνεται στο Γράφημα 2.

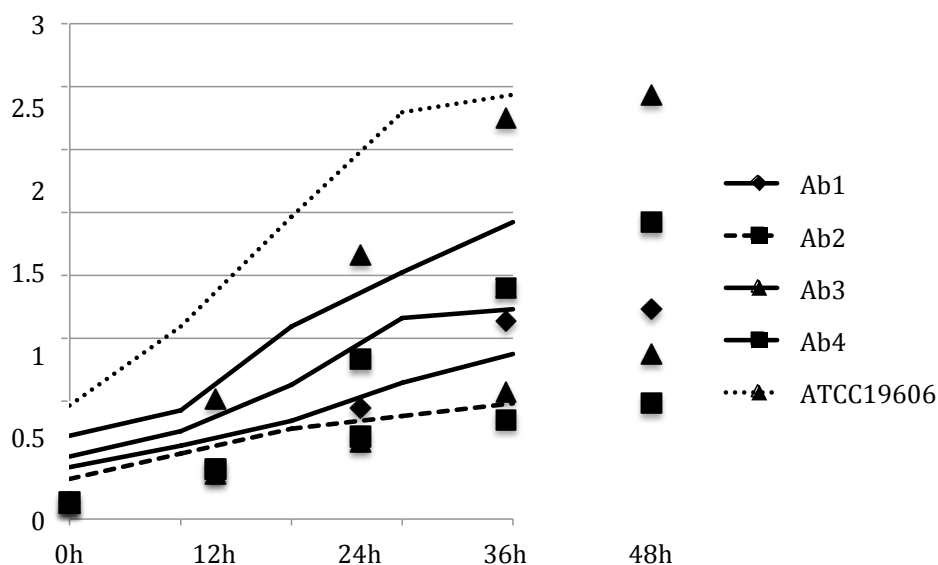


Γράφημα 2. Σχετική έκφραση των γονιδίων *pmrCAB* στα ColR και ColS στελέχη. **(α)** Ab249 έναντι Ab248, **(β)** Ab347 έναντι Ab299. Το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων *pmrCAB* στα ColS στελέχη είναι ίσο προς 1. Οι τιμές παριστάνουν τους μέσους όρους \pm τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων *pmrCAB* ήταν σημαντικές ($P < 0.05$ για όλα τα γονίδια).

2.7. *In vitro* δοκιμασίες προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης

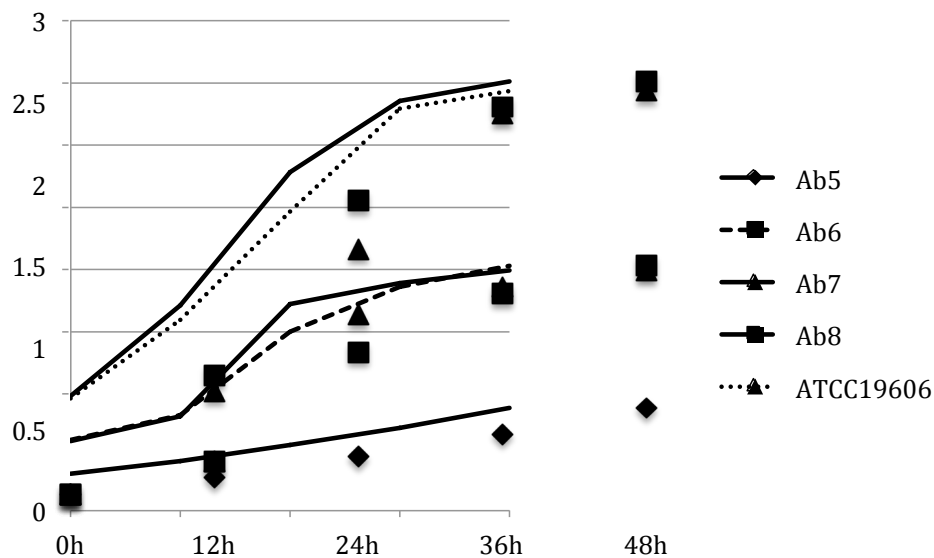
Οι καμπύλες ανάπτυξης των οκτώ ColR στελεχών σε σύγκριση με το στέλεχος ελέγχου ATCC 19606 με τη μέθοδο των γυάλινων σωληναρίων παρουσιάζονται στα Γραφήματα 3α και 3β. Όπως φαίνεται, όλα τα στελέχη εκτός από το Ab8, εμφάνισαν χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το στέλεχος ATCC 19606 ($P < 0.05$).

Οι καμπύλες ανάπτυξης για τα δύο ζευγάρια των ColS/ColR στελεχών (μέθοδος των γυάλινων σωληναρίων) φαίνονται στα Γραφήματα 4α και 4β. Η ανάπτυξη των ColR στελεχών ήταν σημαντικά βραδύτερη από εκείνη των αντίστοιχων ColS στελεχών, με τη διαφορά να είναι σημαντική σε όλα τα χρονικά σημεία για το ζεύγος Ab299/Ab347 και στις 24-48 ώρες για το ζεύγος Ab248/Ab249 ($P < 0.05$). Επίσης, οι αποικίες του ColR στελέχους Ab347 (προήλθαν από τα σωληνάρια μελέτης του ρυθμού ανάπτυξης) ήταν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με εκείνες του ColS στελέχους Ab299. Η μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης με τη μέθοδο της μικροπλάκας-σπεκτροφωτόμετρου παρήγαγε παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή παρατηρήθηκε χαμηλότερη ανάπτυξη για τα ColR στελέχη ($P < 0.05$ σε όλα τα χρονικά σημεία από 6 έως και 24 ώρες). Οι ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) ήταν ως εξής: 0.24/0.18 για το ζεύγος Ab248/Ab249 και 0.25/0.16 για το ζεύγος Ab299/Ab347 ($P < 0.05$).

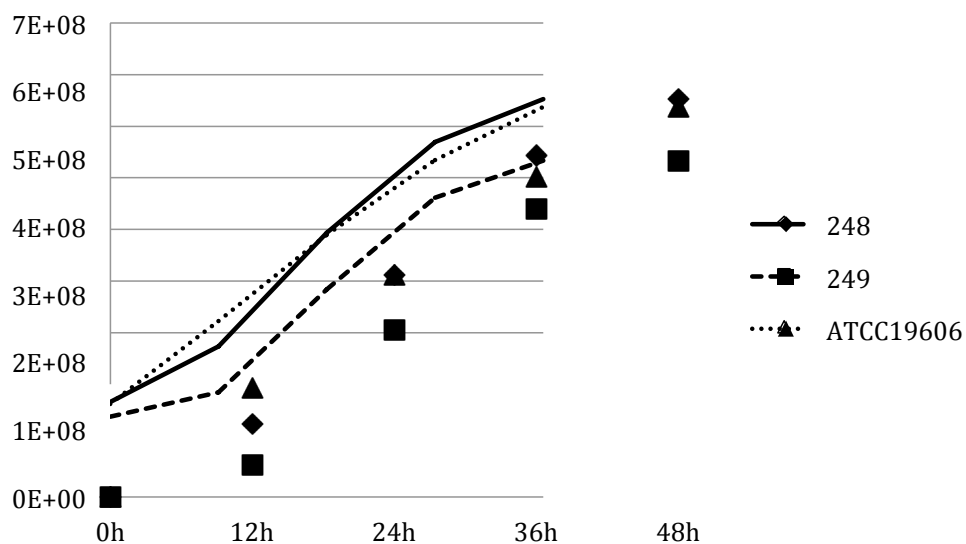


Γράφημα 3α. Καμπύλες ανάπτυξης των ColR στελεχών Ab1, Ab2, Ab3 και Ab4 σε σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606.

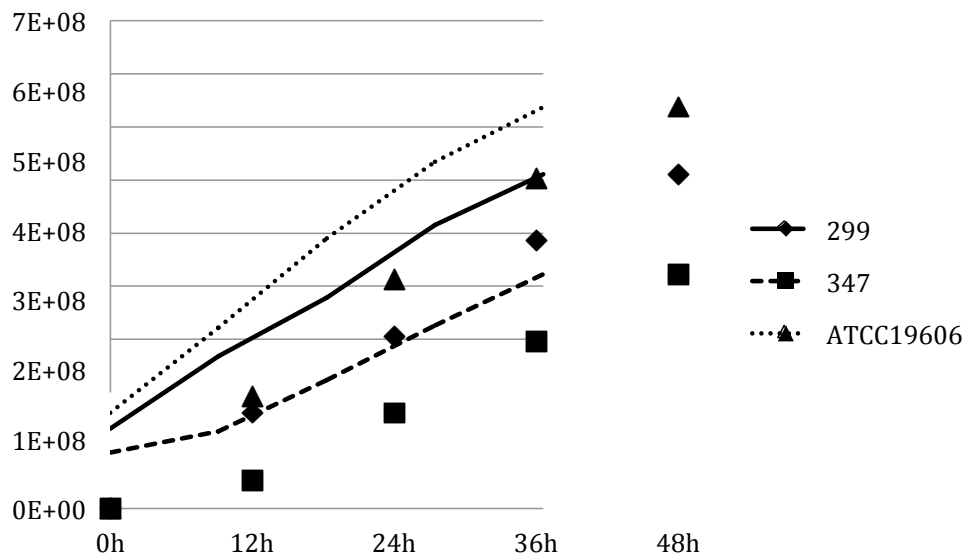
άξονας y: θολερότητα (κλίμακα McFarland), άξονας x: χρόνος ανάπτυξης (h, ώρες).



Γράφημα 3β. Καμπύλες ανάπτυξης των ColR στελεχών Ab5, Ab6, Ab7 και Ab8 σε σύγκριση με το πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* ATCC 19606.
 άξονας y: θολερότητα (κλίμακα McFarland), άξονας x: χρόνος ανάπτυξης (h, ώρες).



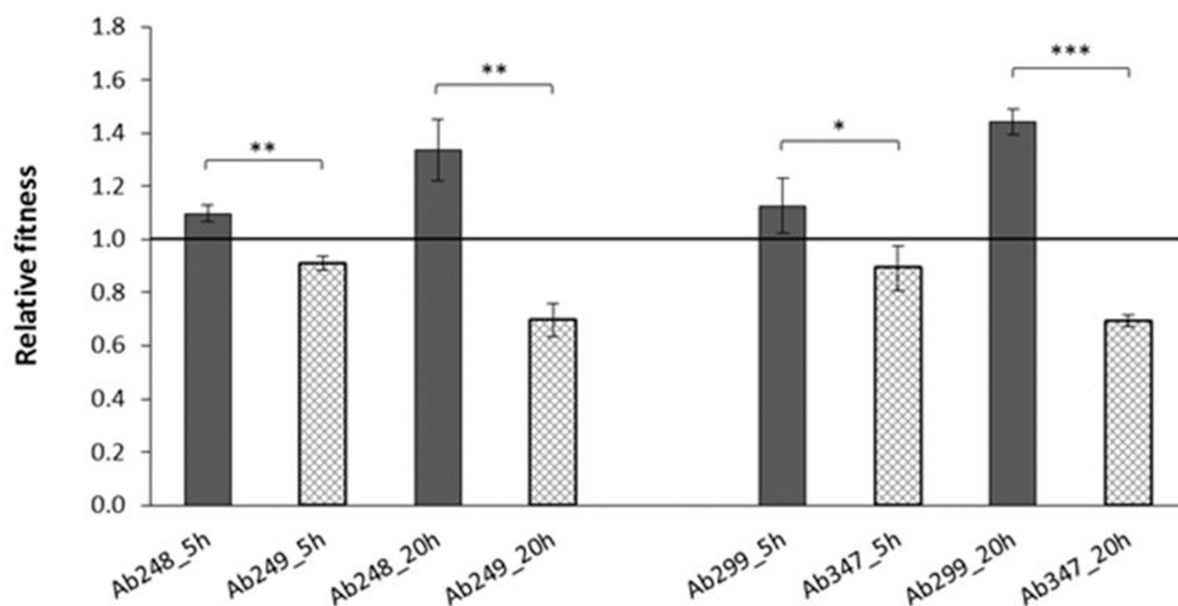
Γράφημα 4α. Καμπύλες ανάπτυξης των ColS/ColR στελεχών Ab248/Ab249, αντίστοιχα.
 άξονας y: CFUs/ml, άξονας x: χρόνος ανάπτυξης (h, ώρες).



Γράφημα 4β. Καμπύλες ανάπτυξης των ColS/ColR στελεχών Ab299/Ab347, αντίστοιχα.
 άξονας y: CFUs/ml, άξονας x: χρόνος ανάπτυξης (h, ώρες).

2.8. *In vitro* δοκιμασίες ανταγωνισμού

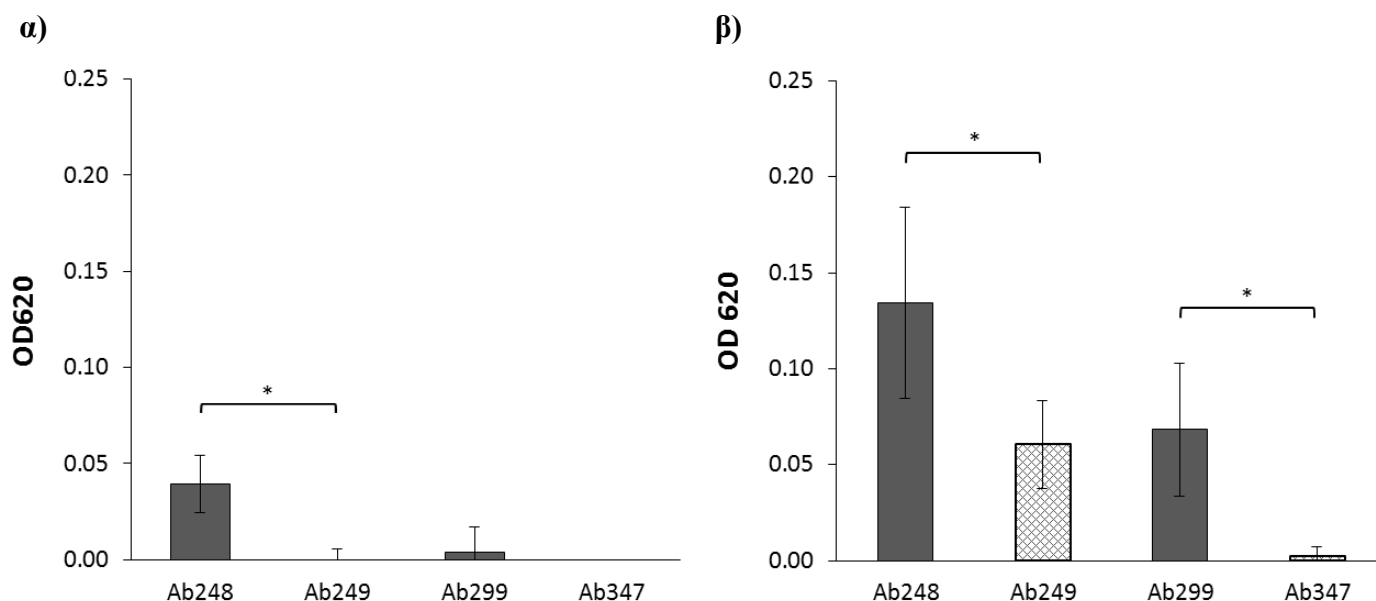
Τα *in vitro* πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ των ColS/ColR στελεχών των δύο ζευγών αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική επιβράδυνση στην ικανότητα ανάπτυξης στα ColR στελέχη (Γράφημα 5). Αναλυτικότερα, το ColR στέλεχος Ab249 έδειξε μια μέση μείωση στην ικανότητα ανάπτυξης 17% σε 5 ώρες (σχετική ικανότητα ανάπτυξης = 0.91, SD = 0.03, $P = 0.001$) και 47,9% στις 20 ώρες (σχετική ικανότητα ανάπτυξης = 0.70, SD = 0.06, $P = 0.001$) σε σύγκριση με το συναγωνιζόμενο ColS στέλεχος Ab248. Ομοίως, το ColR στέλεχος Ab347 παρουσίασε μείωση στην ικανότητα ανάπτυξης 20,7% στις 5 ώρες (σχετική ικανότητα ανάπτυξης = 0.89, SD = 0.08, $P = 0.038$) και 51,9% στις 20 ώρες (σχετική ικανότητα ανάπτυξης = 0.69, SD = 0.02, $P < 0.001$) σε σχέση με το ColS στέλεχος Ab299.



Γράφημα 5. Σχετική ικανότητα ανάπτυξης (relative fitness) των ColS/ColR στελεχών *A. baumannii*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν στις 5 και 20 ώρες. Τιμές μικρότερες του 1 υποδηλώνουν κόστος προσαρμογής, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1 υποδηλώνουν ικανότητα προσαρμογής. Οι αστερίσκοι δείχνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (* $P < 0.05$, ** $P = 0.001$, *** $P < 0.001$).

2.9. Έλεγχος σχηματισμού βιομεμβράνης - Στατικό και δυναμικό μοντέλο

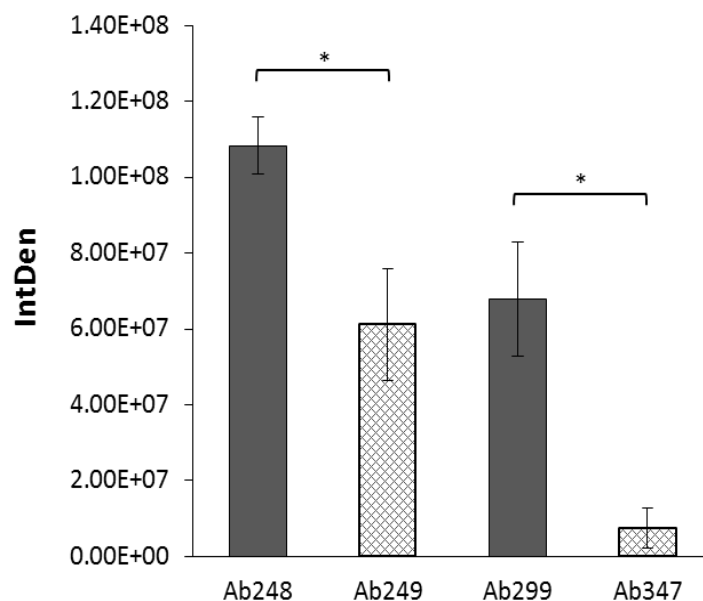
Στη στατική δοκιμασία στις 24 ώρες, και τα δύο ColR στελέχη *A. baumannii* παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή βιομεμβράνης σε σχέση με τα ColS στελέχη (Γράφημα 6β). Ειδικότερα, το ColR στέλεχος Ab249 παρήγαγε λιγότερη βιομεμβράνη κατά 55,1% σε σύγκριση με το ColS ομόλογό του Ab248 (**Ab249**: OD620 = 0.060, SD = 0.023, **Ab248**: OD620 = 0.134, SD = 0.05, $P < 0.001$). Ομοίως, το ColR στέλεχος Ab347 παρουσίασε μείωση στον σχηματισμό βιομεμβράνης κατά 96,4% σε σχέση με το ColS στέλεχος Ab299 (**Ab347**: OD620 = 0.002, SD = 0.005, **Ab299**: OD620 = 0.068, SD = 0.035, $P < 0.001$).



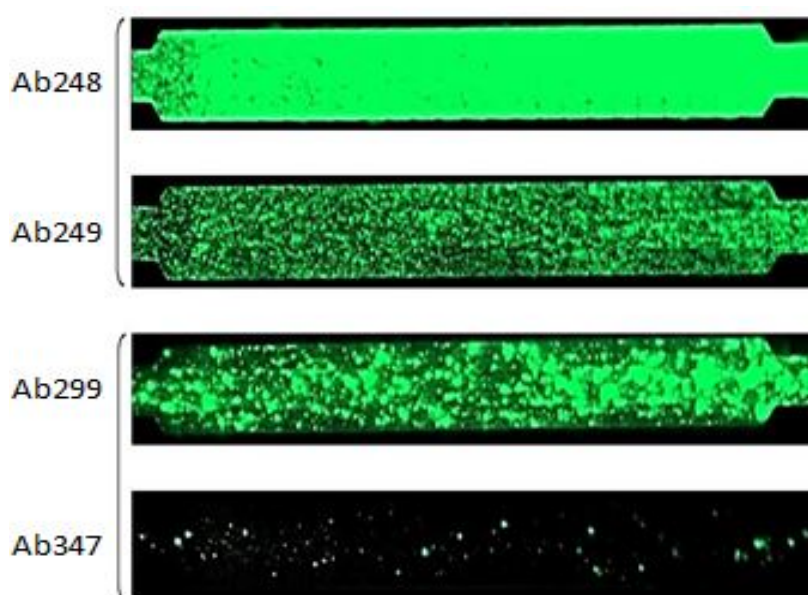
Γράφημα 6. Προσκόλληση και σχηματισμός βιομεμβράνης από τα ColS/ColR στελέχη *A. baumannii* στις 6 ώρες (**α**) και στις 24 ώρες (**β**) με τη στατική δοκιμασία. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, (OD = οπτική πυκνότητα). Οι αστερίσκοι δείχνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (* $P < 0.001$).

Τα ευρήματά μας σε αυτά τα κλινικά στελέχη υποστηρίζουν προηγούμενες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες ColR στελέχη *A. baumannii* που παρήχθησαν *in vitro* επέδειξαν ασθενέστερη παραγωγή βιομεμβράνης από τα ομόλογά τους ColS στελέχη (295,300). Επίσης, χρησιμοποιήσαμε ένα στατικό πρωτόκολλο προσδιορισμού στις 6 ώρες για τον έλεγχο των διαφορών στην αρχική ικανότητα προσκόλλησης μεταξύ των στελεχών του κάθε ζεύγους. Και σε αυτή την περίπτωση το στέλεχος Ab248 έδειξε υψηλότερη παραγωγή βιομεμβράνης σε σχέση με το Ab249 ($P < 0.001$). Τα στελέχη Ab299/Ab347 έδειξαν ορατή καθυστέρηση ανάπτυξης συγκριτικά με το στέλεχος ελέγχου (ATCC 19606) και στην ουσία δεν σχημάτισαν βιομεμβράνη (Γράφημα 6α).

Στην πιο ευαίσθητη δυναμική δοκιμασία στις 6 ώρες, το ColR στέλεχος Ab249 εμφάνισε 43,6% λιγότερη κάλυψη της επιφάνειας και κατ' επέκταση παραγωγή βιομεμβράνης σε σύγκριση με το ColS ομόλογό του Ab248 (**Ab249**: IntDen = $6.11E + 07$, SD = $1.48E + 07$, **Ab248**: IntDen = $1.08E + 08$, SD = $7.51E + 06$, $P < 0.001$). Ομοίως, το ColR στέλεχος Ab347 σχημάτισε 89,2% λιγότερη βιομεμβράνη σε σχέση με το στέλεχος Ab299 (**Ab347**: IntDen = $7.36E + 06$, SD = $5.35E + 06$, **Ab299**: IntDen = $6.78E + 07$, SD = $1.50E + 07$, $P < 0.001$) (Γράφημα 7, Εικόνα 2).



Γράφημα 7. Προσκόλληση και σχηματισμός βιομεμβράνης από τα ColS/ColR στελέχη *A. baumannii* με τη δυναμική δοκιμασία. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, (IntDen = ολική πυκνότητα). Οι αστερίσκοι δείχνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (* $P < 0.001$).



Εικόνα 2. Κανάλια Bioflux με μικροσκοπία φθορισμού.

2.10. Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος των ColS/ColR στελεχών

Η σύγκριση των γονιδιωμάτων μεταξύ των ColS/ColR στελεχών του κάθε ζεύγους επιβεβαίωσε τη μετάλλαξη (αντικατάσταση ενός αμινοξέος) που είχε ανιχνευθεί νωρίτερα με απλή PCR στην πρωτεΐνη pmrB στα ColR στελέχη. Επίσης, στο ColR στέλεχος Ab249 παρατηρήθηκε μια μετάλλαξη που οδήγησε στη μετατροπή ενός κωδικονίου τερματισμού σε λυσίνη (*241K) στην πρωτεΐνη LpsB. Πρόκειται για μια συντηρημένη γλυκοζυλοτρανσφεράση που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του πυρήνα του λιποπολυσακχαρίτη (193) και ενδεχομένως είναι σημαντική για τη λοιμογόνο δύναμη και την αντοχή στην κολιστίνη στα *A. baumannii* (330). Ακόμη, είναι ενδιαφέρον ότι στο ColR στέλεχος Ab347 παρατηρήσαμε την απώλεια μιας γονιδιωματικής περιοχής που αποτελούνταν από 47.969 bp. Μεταξύ άλλων, η περιοχή αυτή περιείχε τα γονίδια *mrkC*, *mrkD*, *modA*, *modB*, *modC*, *modD* και *ppk*, τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται με την παραγωγή βιομεμβράνης σε στελέχη *Enterobacteriaceae* ή *Pseudomonas* (331–333). Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η απώλεια των γονιδίων *mrkC* (pilin) και *mrkD* (assembly chaperone), τα οποία αποτελούν μέρος του συστήματος Chaperon-Usher (CU) assembling pili που απαιτείται για τη συναρμολόγηση πολλαπλών υπομονάδων ινιδίων και τη δημιουργία βιομεμβράνης. Όπως έδειξαν προηγούμενες μελέτες, η αποδιοργάνωση τέτοιων συστημάτων συναρμολόγησης ινιδίων, όπως το Csu ή το Fim, προκάλεσε σημαντική μείωση στον σχηματισμό βιομεμβράνης σε στελέχη *A. baumannii* (180,334). Η απώλεια των εν λόγω γονιδίων και της γονιδιωματικής περιοχής επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της αλληλουχίας κατά Sanger και WGM (335). Επιπλέον, στο στέλεχος Ab347 παρατηρήθηκε μια μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου (A19fs) στην πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης CarO, η οποία θεωρείται ότι σχετίζεται με τον σχηματισμό βιομεμβράνης (187). Έτσι λοιπόν, όλες οι παραπάνω γενετικές τροποποιήσεις που συνέβησαν στο στέλεχος Ab347 θα μπορούσαν να εξηγήσουν, εν μέρει, τη σχεδόν πλήρη απουσία της παραγωγής βιομεμβράνης που παρατηρήθηκε.

3. Πολυκεντρική μοριακή επιδημιολογική μελέτη ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii*

3.1. Δεδομένα ασθενών

Από τους 194 ασθενείς στους οποίους απομονώθηκαν τα CRAB στελέχη, το 70,1% ήταν άνδρες και το 29,9% γυναίκες. Το 56,2% των ασθενών νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ (56,2%), 20,6% σε Κλινικές του Παθολογικού Τομέα, 17% σε Κλινικές του Χειρουργικού Τομέα, 2,1% σε Κέντρο Αποκατάστασης και Αποθεραπείας, ενώ 4,1% ήταν εξωτερικοί ασθενείς. Τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από αίμα (45,9%) και ακολούθως από δείγματα της αναπνευστικής οδού (21,6%), δείγματα δέρματος και μαλακών μορίων (11,3%), ούρα (9,3%) και διάφορα άλλα υλικά (11,9%).

3.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά

Όσον αφορά στον έλεγχο ευαισθησίας, και τα 194 CRAB στελέχη είχαν MICs στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$. Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε όλες τις φθοριοκινολόνες και τις β-λακτάμες που ελέγχθηκαν, εκτός από την αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη (5,2% των στελεχών ήταν ευαίσθητα). Τα ποσοστά ευαισθησίας στα υπόλοιπα αντιβιοτικά ήταν τα εξής: γενταμικίνη (9,4%), αμικασίνη (15,5%), τομπραμυκίνη (22,9%), τετρακυκλίνη (10,3%), τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (34,6%), μινοκυκλίνη (71,6%) και κολιστίνη (72,7%). Για την τιγκεκυκλίνη, οι MIC_{50/90} ήταν 1/2 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Το 3,1% των στελεχών της μελέτης ήταν MDR, το 78,4% XDR και το 18,6% PDR.

3.2.1. Συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη

Για τα 117 στελέχη που μελετήθηκαν, η ευαισθησία στην κολιστίνη, η EA, η CA, τα VMEs και τα MEs που παρατηρήθηκαν με την κάθε μέθοδο παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Εν συντομία, 18 στελέχη (15,4%) ήταν ανθεκτικά με το Phoenix100, 19 (16,2%) με το Vitek 2, 29 (24,8%) με τη μέθοδο BMD και 42 (35,9%) με τη μέθοδο AD. Χρησιμοποιώντας την BMD ως μέθοδο αναφοράς, η EA ήταν 91,4% για το Phoenix100, 88,9% για το Vitek 2 και 93,2% για την AD, ενώ η CA ήταν 88,9% για το Phoenix100, 89,7% για το Vitek 2 και 87,2% για την AD. Τα αυτοματοποιημένα συστήματα συνολικά υποεκτίμησαν την αντοχή

στην κολιστίνη αποδίδοντας πολυάριθμα VMEs (41,4% το Phoenix100 και 37,9% το Vitek 2), ενώ παρήγαγαν σχετικά περιορισμένα MEs (1,1% και τα δύο συστήματα). Τα ποσοστά των VMEs και με τις δύο μεθόδους ήταν σημαντικά υψηλότερα μεταξύ των στελεχών που εμφάνισαν MIC στο όριο ευαισθησίας (2 µg/ml) σε σύγκριση με εκείνα τα στελέχη που είχαν MICs ≤ 1 µg/ml. Ειδικότερα, το 46,2% των στελεχών που είχαν MIC 2 µg/ml με το Phoenix100 ήταν ανθεκτικά με τη μέθοδο BMD, σε σύγκριση με το 7% των στελεχών που είχαν MIC ≤ 1 µg/ml, ενώ τα αντίστοιχα δεδομένα για το Vitek 2 ήταν 33,3% και 9%. Αντίθετα με τα αυτόματα συστήματα, η μέθοδος AD απέδωσε σχετικά περιορισμένα VMEs (3,4%) και πολύ περισσότερα MEs (15,9%), καθώς παρήγαγε υψηλότερες MICs από την BMD, όπως ήδη έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (161).

Πίνακας 14. Ευαισθησίες των στελεχών *A. baumannii* στην κολιστίνη, MIC_{S50/90} που παρήχθησαν με τις μεθόδους BMD, AD, Phoenix100, Vitek 2 και EA, CA και τα είδη των σφαλμάτων με την κάθε μέθοδο σε σύγκριση με την BMD

Μέθοδος	No. (%) των στελεχών		MIC (µg/ml)		No. (%) των στελεχών			
	Ευαίσθητα	Ανθεκτικά	50%	90%	EA	CA	VME	ME
BMD	88 (75,2)	29 (24,8)	≤ 0.5	8				
AD	75 (64,1)	42 (35,9)	1	≥ 16	109 (93,2)	102 (87,2)	1 (3,4)	14 (15,9)
Phoenix100	99 (84,6)	18 (15,4)	1	4	107 (91,4)	104 (88,9)	12 (41,4)	1 (1,1)
Vitek 2	98 (83,8)	19 (16,2)	0.5	≥ 16	104 (88,9)	105 (89,7)	11 (37,9)	1 (1,1)

3.3. Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών και αλληλουχιών εισδοχής

Η συντριπτική πλειοψηφία των CRAB στελεχών έφερε την *bla*_{OXA-23-like} καρβαπενεμάση ($n=188$, 96,9%). Σε 3 στελέχη (1,6%) ανευρέθησαν μαζί και τα δύο γονίδια των καρβαπενεμασών *bla*_{OXA-23-like} και *bla*_{OXA-58-like}, σε 2 στελέχη (1%) ανιχνεύθηκε το γονίδιο *bla*_{OXA-58-like}, ενώ σε 1 στέλεχος (0,5%) το γονίδιο *bla*_{OXA-40-like}. Η αλληλουχία εισδοχής

ISAbal ανιχνεύθηκε ανοδικά του γονιδίου *bla*_{OXA-23-like} και στα 191 στελέχη που ήταν θετικά για την *bla*_{OXA-23-like} καρβαπενεμάση και ανοδικά του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like} σε 44 στελέχη (22,7%).

3.4. Μοριακή επιδημιολογία

Το σχήμα τυποποίησης που βασίζεται στις δύο multiplex PCRs ταξινομήσε το μεγαλύτερο μέρος των CRAB στελεχών ($n=151$, 77,8%) στο G1, που αντιστοιχεί στον διεθνή κλώνο IC2. Επιπλέον, 14 στελέχη (7,2%) κατανεμήθηκαν στο G2, που αντιστοιχεί στον διεθνή κλώνο IC1, ενώ 1 στέλεχος ταξινομήθηκε στο G6. Τα υπόλοιπα 28 στελέχη εμφάνισαν τρία διαφορετικά πρότυπα ζωνών. Αναλυτικότερα, σε 6 στελέχη ενισχύθηκαν τα αλληλία G1 *ompA/bla*_{OXA-66}, σε 21 στελέχη τα αλληλία G1 *csuE/G2 ompA/bla*_{OXA-69} και σε 1 στέλεχος τα αλληλία G2 *ompA/bla*_{OXA-69}.

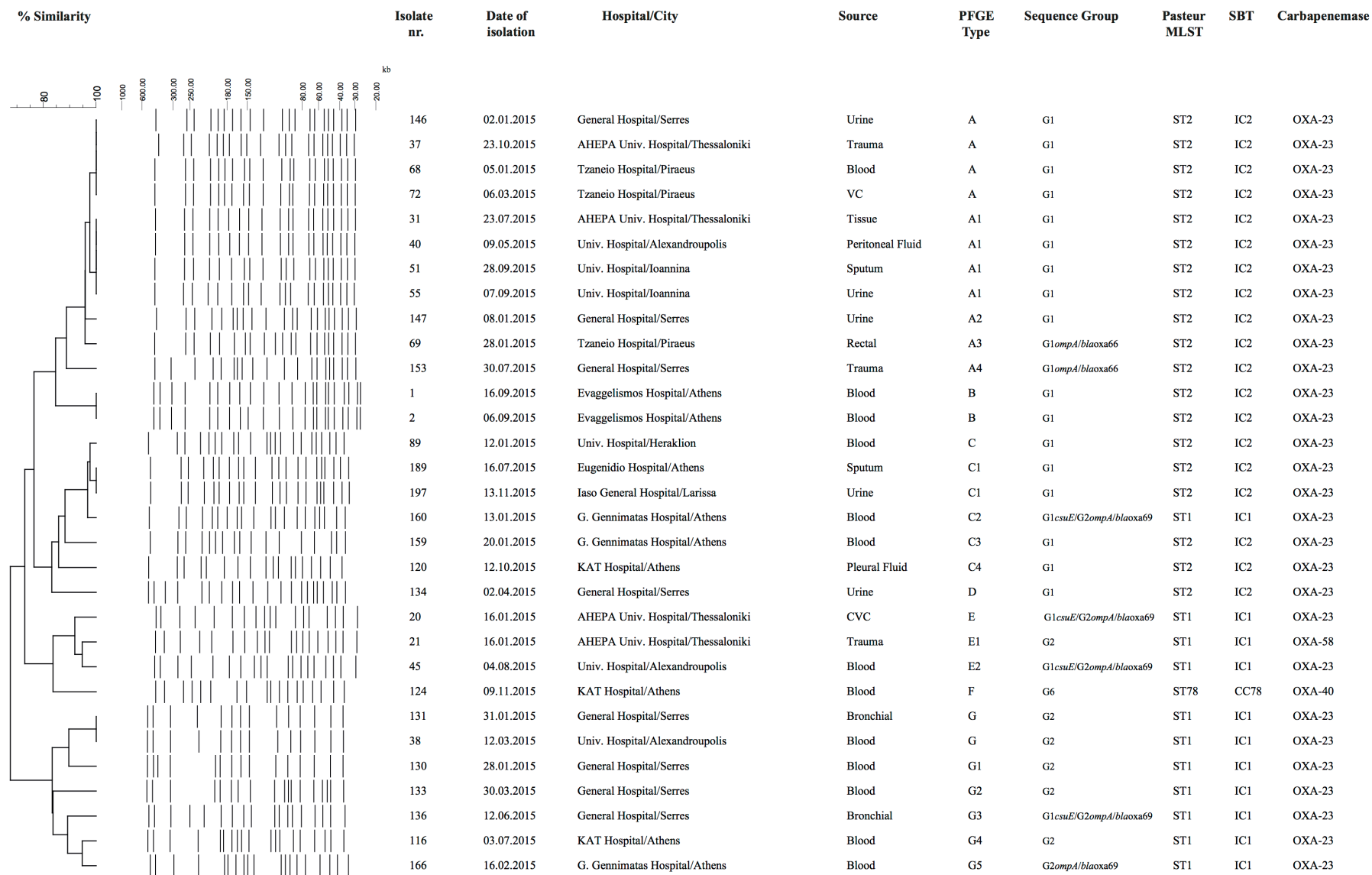
Σύμφωνα με το σχήμα SBT, 157 στελέχη (80,9%) έφεραν το γονίδιο *bla*_{OXA-66} και επομένως ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC2, ενώ 36 στελέχη (18,6%) έφεραν το γονίδιο *bla*_{OXA-69} και άρα ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC1. Ακόμη, το μοναδικό στέλεχος που ανήκε στο G6 έφερε την οξακιλλινάση *bla*_{OXA-90}. Με τη μέθοδο MLST επιβεβαιώθηκε η παραπάνω ταξινόμηση, καθώς όλα τα στελέχη του διεθνούς κλώνου IC2 που εξετάστηκαν ανήκαν στον τύπο ST2. Κατά τον ίδιο τρόπο, όλα τα στελέχη του διεθνούς κλώνου IC1 ανήκαν στον τύπο ST1, ενώ το στέλεχος στο οποίο ανιχνεύτηκε η οξακιλλινάση *bla*_{OXA-90} ανήκε στον τύπο ST78. Με τη μέθοδο PFGE ταυτοποιήθηκαν επτά διακριτοί κλώνοι: A, B, C, D, E, F και G. Όπως παρατηρήθηκε, τα στελέχη του τύπου ST2 ανήκαν στους κλώνους A (τέσσερις υπότυποι), B, C (πέντε υπότυποι) και D, ενώ τα στελέχη του τύπου ST1 ανήκαν στους κλώνους E (τρεις υπότυποι) και G (έξι υπότυποι). Τα αποτελέσματα τυποποίησης των 31 αντιπροσωπευτικών στελεχών της μελέτης, τα οποία ελέγχθησαν με όλες τις μεθόδους παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.

Τα στελέχη που ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC2 ανιχνεύθηκαν σε όλα τα νοσοκομεία της μελέτης και αποτελούσαν τη συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών (128/137, 93,4%) που απομονώθηκαν από τη Δυτική, Κεντρική και Νότια Ελλάδα. Τα στελέχη που ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC1 εντοπίστηκαν μόνο σε έξι νοσοκομεία. Μάλιστα τα τρία από αυτά βρίσκονται στη Βόρεια Ελλάδα, όπου ο κλώνος IC1 ήταν αρκετά συχνός, καθώς βρέθηκε ότι σε αυτόν ανήκαν τα 28 από τα 57 CRAB (49,1%) που εξετάστηκαν.

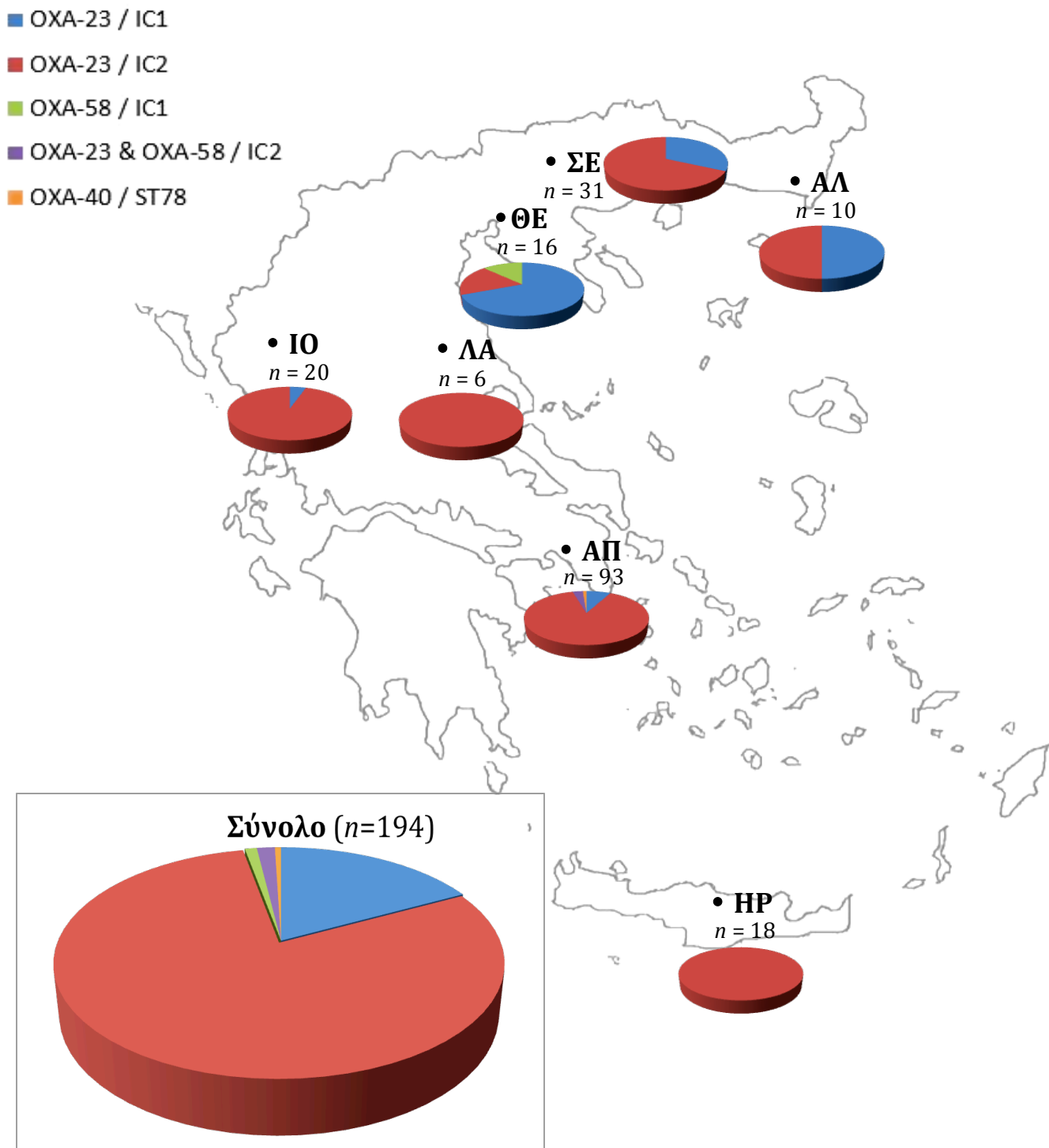
Από τα στελέχη που ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC2 ($n=157$) τα 154 έφεραν *bla*_{OXA-23-like}, ενώ τρία στελέχη έφεραν ταυτόχρονα τις καρβαπενεμάσες *bla*_{OXA-23-like} και *bla*_{OXA-58-like}.

Όσον αφορά στα στελέχη που ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC1 ($n=36$), 34 έφεραν *bla*_{OXA-23-like} και δύο *bla*_{OXA-58-like} καρβαπενεμάσες. Ακόμη, στο ST78 στέλεχος ανιχνεύτηκε η καρβαπενεμάση *bla*_{OXA-40-like} για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Η γεωγραφική κατανομή των οξακιλλινασών και των αντίστοιχων διεθνών κλώνων των CRAB στελεχών της μελέτης παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.

Τα στελέχη που ανήκαν στο διεθνή κλώνο IC1 ήταν γενικά λιγότερο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τα στελέχη του κλώνου IC2. Τα ποσοστά ευαισθησίας των IC1/IC2 στελεχών ήταν για τη μινοκυκλίνη 100/65%, την τετρακυκλίνη 53,3/1,3%, την τομπραμυκίνη 65,2/16,4%, τη γενταμικίνη 20,7/7,3% και την αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη 11,4/3,2%. Τέλος, μια αντίθετη τάση προς την ευαισθησία υπέρ των στελεχών που ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC2 παρατηρήθηκε για την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, με το 37,6% των στελεχών να είναι ευαίσθητα, σε σύγκριση με το 13,9% για τα στελέχη του κλώνου IC1 (Πίνακας 15).



Εικόνα 3. Χαρακτηριστικά και κλωνική σύνθεση των 31 αντιπροσωπευτικών στελεχών *A. baumannii* που ελέγχθηκαν με τις μεθόδους multiplex PCRs, SBT, PFGE και MLST. Το ποσοστό ομοιότητας (% similarity) στην ανάλυση του δενδρογράμματος και τα μεγέθη σε κιλοβάσεις (kb) του δείκτη μοριακής μάζας λ-DNA υποδεικνύονται πάνω από το δενδρόγραμμα και τα PFGE προφίλ, αντίστοιχα.



Εικόνα 4. Γεωγραφική κατανομή των οξακιλλινασών και των αντίστοιχων διεθνών κλώνων ICs των CRAB στελεχών της μελέτης. Οι μαύρες κουκίδες υποδεικνύουν την τοποθεσία των νοσοκομείων στα οποία απομονώθηκαν τα στελέχη (ΑΛ: Αλεξανδρούπολη, ΣΕ: Σέρρες, ΘΕ: Θεσσαλονίκη, ΙΟ: Ιωάννινα, ΛΑ: Λάρισα, ΑΠ: Αθήνα/Πειραιάς, ΗΡ: Ηράκλειο). Τα χρωματιστά κυκλικά διαγράμματα δείχνουν την επικράτηση των διαφόρων οξακιλλινασών και διεθνών κλώνων σε κάθε περιοχή και συνολικά.

Πίνακας 15. Χαρακτηριστικά των 194 CRAB στελεχών της μελέτης

Group 1 multiplex PCR			Group 2 multiplex PCR			Sequence group, G (n)	IC (OXA-51-like, n)	Καρβαπενεμάση (n)	Ποσοστό ευαισθησίας (%)						
<i>csuE</i>	<i>ompA</i>	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>csuE</i>	<i>ompA</i>	<i>bla</i> _{OXA-51}				SAM	GEN	TOB	TET	MIN	COL	SXT
+	+	+	–	–	–	G1 (151)	IC2 (OXA-66, 157)	OXA-23 (154) OXA-23&OXA-58 (3)	3,2	7,3	16,4	1,3	65,0	72,6	37,6
–	+	+	–	–	–	(6)									
–	–	–	+	+	+	G2 (14)	IC1 (OXA-69, 36)	OXA-23 (34) OXA-58 (2)	11,4	20,7	65,2	53,3	100	72,2	13,9
+	–	–	–	+	+	(21)									
–	–	–	–	+	+	(1)									
–	+	+	+	–	–	G6 (1)	ST78 (OXA-90, 1)	OXA-24 (1)	E	A	A	E	E	E	E
Σύνολο (194)									5,2	9,4	22,9	10,3	71,6	72,7	34,6

IC: διεθνής κλώνος, E: ευαίσθητο, A: ανθεκτικό, SAM: αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη, GEN: γενταμικίνη, TOB: τομπραμυκίνη, TET: τετρακυκλίνη, MIN: μινोκυκλίνη, COL: κολιστίνη, SXT: τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αυξανόμενη συχνότητα της αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* παγκοσμίως απαιτεί τη χρήση αντιβιοτικών τελευταίας εκλογής για τη θεραπεία των σοβαρών λοιμώξεων, ιδιαίτερα στη ΜΕΘ. Ειδικότερα, η μεγάλη διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* περιορίζει ακόμη περισσότερο τις διαθέσιμες επιλογές για τη θεραπεία των λοιμώξεων που αυτά προκαλούν, με αποτέλεσμα η χορήγηση της κολιστίνης να είναι ολοένα και συχνότερα απαραίτητη στην κλινική πράξη (336). Αξίζει να σημειωθεί ότι από το 2011 έως και το 2015 η Ελλάδα εμφανίζεται σταθερά πρώτη στη νοσοκομειακή κατανάλωση της κολιστίνης και μάλιστα με μεγάλη διαφορά σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (337). Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στον υψηλό επιπολασμό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες νοσοκομειακών παθογόνων στη χώρα μας.

Καθώς η χρήση της κολιστίνης αυξάνεται τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί αυξητική τάση της αντοχής της σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο (281, 338), τονίζοντας τη σημασία των αξιόπιστων αποτελεσμάτων ευαισθησίας στην κολιστίνη, ιδιαίτερα όταν πρέπει να ληφθούν σοβαρές θεραπευτικές αποφάσεις. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί συχνά στη βιβλιογραφία ανακρίβειες και ασυμφωνία μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ευαισθησίας στην κολιστίνη σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Η υφιστάμενη αυτή αβεβαιότητα σχετικά με τις μεθόδους προσδιορισμού ευαισθησίας επηρεάζει δυσμενώς την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση της κολιστίνης (156). Επιπλέον, μέχρι τη στιγμή διεξαγωγής της παρούσας μελέτης δεν είχαν διατυπωθεί από το CLSI και τη EUCAST συστάσεις για τις βέλτιστες μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε σε ένα πρώτο στάδιο την απόδοση έξι εμπορικών και πρότυπων μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας στην κολιστίνη σε μία συλλογή 20 CRAB κλινικών στελεχών με αναφερόμενες αυξημένες MICs στην κολιστίνη ($> 2 \mu\text{g/ml}$), κατά τον αρχικό έλεγχο ρουτίνας. Η πρότυπη μέθοδος BMD χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς για τη σύγκριση των υπόλοιπων μεθόδων. Ένα ζήτημα που απασχολεί τον τελευταίο καιρό την επιστημονική κοινότητα είναι η αναγκαιότητα της προσθήκης του επιφανειοδραστικού παράγοντα P80 στα συστήματα δοκιμών ευαισθησίας της κολιστίνης. Γενικά, τα διαθέσιμα στοιχεία για την απόδοση της μεθόδου BMD-P80 είναι περιορισμένα και ειδικά σε στελέχη με αυξημένες MICs. Αυτό που εμείς παρατηρήσαμε είναι ότι η μέθοδος BMD-P80 παρουσίασε την υψηλότερη ΕΑ και μέτρια CA συγκρινόμενη με τη μέθοδο BMD. Το πρόβλημα ήταν ότι παρήγαγε σημαντικά χαμηλότερες MICs ($p < 0.001$), κυρίως στα στελέχη που είχαν MICs 4-8 $\mu\text{g/ml}$ με τη μέθοδο αναφοράς, με αποτέλεσμα να

προκύπτει υψηλό ποσοστό VMEs. Μικρότερες, όμως σημαντικές, μειώσεις στις MICs στην κολιστίνη έχουν επίσης αναφερθεί σε πρόσφατη μελέτη, στην οποία η μέθοδος BMD-P80 συγκρίθηκε με τη μέθοδο αναφοράς BMD (157).

Όσον αφορά στη μέθοδο AD, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει σύμφωνα αποτελέσματα με αυτά της μεθόδου BMD (149, 151). Ομοίως, και στη δική μας μελέτη η συμφωνία CA μεταξύ της μεθόδου AD και BMD ήταν αποδεκτή και τα σφάλματα ήταν σχετικά περιορισμένα. Ωστόσο, η EA ήταν χαμηλή, επειδή η AD είχε την τάση να παράγει υψηλότερες MICs από την BMD κατά 1-2 αραιώσεις, γεγονός που επίσης παρατηρήθηκε στη βιβλιογραφία στο παρελθόν (149).

Μεταξύ των εμπορικών μεθόδων το Etest είναι εύχρηστο και εφαρμόζεται ευρέως στα κλινικά εργαστήρια. Όμως, έχουν εκφραστεί αντιρρήσεις από διάφορους ερευνητές σχετικά με την καταλληλότητά του στον έλεγχο ευαισθησίας της κολιστίνης (154, 155, 279). Η μελέτη μας επιβεβαίωσε τις αντιρρήσεις αυτές, καθώς έδειξε ότι το Etest παρήγαγε γενικά χαμηλότερες MICs από την BMD, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ψευδώς ευαίσθητα αποτελέσματα. Το ποσοστό των VMEs ήταν εξαιρετικά υψηλό, ενώ τα ποσοστά για την EA και την CA ήταν χαμηλά. Λαμβάνοντας υπόψη ότι πολλά κλινικά εργαστήρια στηρίζονται επί του παρόντος στη μέθοδο του Etest για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στην κολιστίνη σε MDR Gram-αρνητικά βακτήρια, αυτή η ψευδής ευαισθησία θα μπορούσε να οδηγήσει σε ακατάλληλη χορήγηση κολιστίνης. Μελέτες που δημοσιεύθηκαν στο παρελθόν, οι οποίες κατά κύριο λόγο είχαν ελέγξει στελέχη με χαμηλότερες MICs, ανέφεραν υψηλότερη EA και πολύ χαμηλότερα ποσοστά VMEs από ό, τι τα αποτελέσματά μας. Ωστόσο, μια μελέτη που περιελάμβανε περισσότερα στελέχη *A. baumannii* με αυξημένες MICs επισήμανε ότι το Etest απέδωσε σημαντικά χαμηλότερες MICs και υψηλά ποσοστά VMEs συγκρινόμενο με τη μέθοδο BMD-P80 (154), επιβεβαιώνοντας τις παρατηρήσεις μας.

Η δεύτερη μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης που ελέγχθηκε, το MTS, παρουσίασε επίσης ψευδώς ευαίσθητα αποτελέσματα, αφού παρήγαγε χαμηλότερες MICs από την BMD για τα περισσότερα στελέχη *A. baumannii*. Είναι ενδιαφέρον ότι ένας σημαντικός αριθμός στελεχών που είχαν MIC στο όριο ευαισθησίας (2 µg/ml) με το MTS εμφάνισαν μία ή δύο αραιώσεις υψηλότερες MICs με την BMD, ήταν δηλαδή, έστω και οριακά, ανθεκτικά. Παρόλα αυτά, συνολικά το MTS παρουσίασε καλύτερες επιδόσεις από την άποψη της EA, της CA και των VMEs σε σύγκριση με το Etest.

Σε πολλά κλινικά εργαστήρια, η κύρια μέθοδος ρουτίνας για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά είναι η χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων, όπως το Vitek 2. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το Vitek επέδειξε κατάλληλη απόδοση στον έλεγχο

ευαισθησίας στην κολιστίνη για τα *A. baumannii* συγκρινόμενο με την BMD ή την AD ως μέθοδο αναφοράς (151, 153, 155). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές περιελάμβαναν κυρίως ευαίσθητα στην κολιστίνη στελέχη *A. baumannii*. Τα δεδομένα της πρώτης μελέτης μας υποδηλώνουν ότι το Vitek 2 φάνηκε αρχικά να είναι χρήσιμη μέθοδος για την ταχεία ανίχνευση της αντοχής στην κολιστίνη, καθώς επέδειξε εξαιρετική CA όταν συγκρίθηκε με τη μέθοδο BMD. Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη μεταγενέστερη πολυκεντρική μελέτη μας, η οποία διεξήχθη σε μεγαλύτερη και πιο αντιπροσωπευτική συλλογή CRAB κλινικών στελεχών, βρέθηκε ότι και το Vitek 2 αλλά και το άλλο αυτόματο σύστημα που ελέγχθηκε, το Phoenix100, παρήγαγαν χαμηλότερες MICs από την BMD, οδηγώντας σε ψευδώς ευαίσθητα αποτελέσματα σε αναλογία μεγαλύτερη από το 1/3 των στελεχών. Και με τα δύο συστήματα τα VMEs ήταν πολύ πιο συχνά για στελέχη με MIC 2 µg/ml σε σχέση με εκείνα που είχαν MIC ≤1 µg/ml, υποδεικνύοντας ότι στελέχη με τιμές MIC στο όριο της ευαισθησίας (2 µg/ml) θα πρέπει να ελέγχονται κατά προτίμηση με τη δοκιμασία BMD.

Συνολικά, όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις έδειξαν σημαντική ασυμφωνία μεταξύ των μεθόδων ευαισθησίας στην κολιστίνη, με καμία από τις μεθόδους που ελέγχθηκαν να μην πληροί τα κριτήρια για την αποδεκτή απόδοση των μεθόδων κατά ISO. Η πιο αξιοσημείωτη παρατήρηση ήταν η σημαντική ανεπάρκεια των μεθόδων κλιμακωτής διάχυσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ακατάλληλη επιλογή θεραπείας με κολιστίνη. Αλλά και τα αυτοματοποιημένα μηχανήματα φαίνεται ότι παρουσιάζουν σημαντικά προβλήματα, υποεκτιμώντας συχνά τις MICs. Ως εκ τούτου, είναι κρίσιμης σημασίας για τα κλινικά εργαστήρια να είναι ενημερωμένα για τις αποκλίσεις μεταξύ των μεθόδων και να προχωρούν στην εφαρμογή μιας μεθόδου αναφοράς για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη, ειδικά όταν η χορήγησή της κρίνεται απαραίτητη.

Η μεγαλύτερη επιβεβαίωση για την έρευνά μας σχετικά με τις μεθόδους ευαισθησίας στην κολιστίνη ήρθε περίπου ένα χρόνο μετά τη δημοσίευση των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων σε έγκριτο επιστημονικό περιοδικό, όταν τον Μάρτιο του 2016 η κοινή επιτροπή της EUCAST και του CLSI εξέδωσε για πρώτη φορά συστάσεις για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη (323). Σύμφωνα με αυτές, η μέθοδος αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη σε στελέχη *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* spp. είναι η προτυποποιημένη κατά ISO μέθοδος BMD. Επίσης, συστήθηκε να μην προστίθενται στις δοκιμές BMD επιφανειοδραστικοί παράγοντες, όπως το P80. Τέλος, προτάθηκε οι υπόλοιπες μέθοδοι, όπως η μέθοδος διάχυσης των δίσκων, η AD και οι ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης να μη χρησιμοποιούνται μέχρι νεοτέρας.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι οι συστάσεις αυτές βασίστηκαν μόνο σε βιβλιογραφική ενημέρωση. Λίγους μήνες αργότερα, τον Ιούλιο και τον Αύγουστο του 2017, ανακοινώθηκαν από την κοινή επιτροπή της EUCAST και του CLSI δύο νέες ενημερώσεις με τον τίτλο “Προειδοποίηση σχετικά με τη χρήση των διαθέσιμων ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης κολιστίνης” (339). Το δίκτυο εργαστηρίων της EUCAST αξιολόγησε τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης κολιστίνης δύο εταιρειών (bioMérieux, Liofilchem) σε μια συλλογή από 23 στελέχη *E. coli*, *Salmonella* spp. και άλλα εντεροβακτηριακά χωρίς αντοχή και με διάφορους μηχανισμούς αντοχής στην κολιστίνη. Αυτό που βρέθηκε ήταν ότι οι ταινίες και των δύο εταιρειών υποεκτίμησαν τις MICs κατά μία ή περισσότερες υποδιπλάσιες αραιώσεις, ειδικά σε στελέχη με συγκεντρώσεις στο όριο ευαισθησίας ή πάνω από αυτό (≥ 2 mg/L), οδηγώντας σε VMEs. Η EUCAST ενημέρωσε και τις δύο κατασκευάστριες εταιρείες, οι οποίες εργάζονται πλέον για τη βελτίωση των προϊόντων τους, αν και εκφράστηκαν αμφιβολίες για το εάν αυτό το ζήτημα μπορεί να επιλυθεί μόνο με επαναβαθμονόμηση των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης. Τα ημιαυτόματα συστήματα (Vitek 2, Phoenix ή MicroScan) δεν αξιολογήθηκαν συστηματικά κι έτσι η επιτροπή δεν μπορούσε να προτείνει τη χρήση ή τη μη χρήση τους στις δοκιμές ευαισθησίας της κολιστίνης. Το τελικό συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε η επιτροπή ήταν: “Συνιστούμε στα εργαστήρια να αποφεύγουν τις διαθέσιμες έως σήμερα ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης κολιστίνης και αντ' αυτών να χρησιμοποιούν τη μέθοδο BMD. Οι έρευνές μας δείχνουν σαφώς ότι οι ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης υποεκτιμούν τις MICs στην κολιστίνη. Τιμές MIC με τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης πάνω από το όριο ευαισθησίας είναι πιο πιθανό να προβλέψουν την αντοχή, ενώ οι MICs που εμπίπτουν στην περιοχή του εύρους ευαισθησίας είναι πολύ λιγότερο αξιόπιστες. Σημαντική για την απόδοση της μεθόδου είναι, επίσης, η τήρηση των οδηγιών του κατασκευαστή. Παρόλα αυτά, τιμές MIC με τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης στην περιοχή του 0.5 έως 2 mg/L πρέπει να επιβεβαιώνονται με τη μέθοδο BMD”. Τον Νοέμβριο του 2017 η επιτροπή της EUCAST και του CLSI εξέδωσε νέες προειδοποιήσεις σχετικά με τις μεθόδους ελέγχου ευαισθησίας στην κολιστίνη, επιβεβαιώνοντας για άλλη μια φορά τη μεγάλη σημασία και έκταση που έχει λάβει πρόσφατα το συγκεκριμένο θέμα. Στην τελευταία αυτή ανακοίνωση η συλλογή των μικροβίων που ελέγχθησαν έχει επεκταθεί και περιλαμβάνει πλέον 75 στελέχη *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* spp. χωρίς αντοχή και με διάφορους μηχανισμούς αντοχής στην κολιστίνη και σε διάφορα επίπεδα. Η επιτροπή κατέληξε στα ίδια περίπου συμπεράσματα, δηλαδή ότι η μέθοδος διάχυσης των δίσκων και οι ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού πρέπει να αποφεύγονται. Επίσης, πρόσθεσε ότι

παρόλο που τα αυτοματοποιημένα συστήματα ευαισθησίας δεν έχουν αξιολογηθεί συστηματικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι παράγουν αρκετά VMEs. Τέλος, κατά τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη θα πρέπει να διενεργείται ποιοτικός έλεγχος που να περιλαμβάνει ένα ευαίσθητο (*E. coli* ATCC 25922 ή *P. aeruginosa* ATCC 27853), αλλά κι ένα ανθεκτικό στέλεχος ελέγχου (*E. coli* NCTC 13846), καθώς τα περισσότερα προβλήματα δημιουργούνται σε στελέχη που έχουν MICs 2-8 mg/L με τη μέθοδο BMD.

Όπως προαναφέρθηκε, η διαδεδομένη χορήγηση κολιστίνης στα νοσοκομειακά θεραπευτικά σχήματα έχει ως αποτέλεσμα να ασκείται πίεση επιλογής για την ανάπτυξη ανθεκτικών κλινικών στελεχών *A. baumannii*, με ολοένα αυξανόμενες αναφορές από πολλές περιοχές (7, 340). Ο ακριβής μηχανισμός της αντοχής στην κολιστίνη δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί, αν και δύο μη συσχετιζόμενοι μηχανισμοί αντοχής που επηρεάζουν το λιπίδιο A, μόριο-στόχο της κολιστίνης, έχουν περιγραφεί σε στελέχη *A. baumannii* από διαφορετικούς ερευνητές. Η πρώτη υπόθεση πρότεινε την πλήρη απώλεια της παραγωγής του λιποπολυσακχαρίτη μέσω αδρανοποίησης των γονιδίων της βιοσύνθεσης του λιπιδίου A, *lpxA*, *lpxC* και *lpxD* (287). Σύμφωνα με τον δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό, μεταλλάξεις στα γονίδια *pmrA* και *pmrB* που οδηγούν σε προσθήκη φωσφοαιθανολαμίνης στο επτά-ακυλωμένο λιπίδιο A συνδέονται με την αντοχή στην κολιστίνη στο *A. baumannii* σε συνδυασμό με αυξημένη έκφραση του συστήματος PmrCAB (285, 329, 341). Στη μελέτη μας που πραγματοποιήθηκε σε δύο ζεύγη ColS/ColR κλινικών στελεχών *A. baumannii* οι κύριοι μηχανισμοί που συνέβαλαν στην ανάπτυξη της αντοχής στην κολιστίνη ήταν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη PmrB σε συνδυασμό με υπερέκφραση του *pmrCAB*, ενώ τα γονίδια *lpxA*, *lpxC* και *lpxD* δεν επηρεάστηκαν. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες από τις προηγούμενες κλινικές ή εργαστηριακές αναφορές για τους μηχανισμούς αντοχής στην κολιστίνη στο *A. baumannii*, η ανάπτυξη αντοχής συνδέθηκε με την έκθεση στην κολιστίνη (7, 285, 289), όπως και στις δικές μας κλινικές περιπτώσεις.

Τα ColR στελέχη *A. baumannii* έχουν στο παρελθόν συνδεθεί με μειωμένη λοιμογόνο δύναμη συγκριτικά με τα ColS ομόλογα στελέχη τους, όπως αντικατοπτρίζεται από τη μειωμένη προσαρμοστικότητα και θνησιμότητά τους σε πειραματικά μοντέλα (290). Στη μελέτη μας τα *in vitro* πειράματα του ρυθμού ανάπτυξης και ανταγωνισμού κατέδειξαν ότι τα δύο ColR στελέχη εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά βραδύτερη ανάπτυξη και σχετική ικανότητα ανάπτυξης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ColS προγονικά στελέχη, υποδηλώνοντας αυξημένο κόστος προσαρμογής που τα στελέχη “κατέβαλαν” για την ανάπτυξη του φαινοτύπου αντοχής. Είναι σημαντικό ότι αυτό παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη σε στελέχη που έχουν προκύψει με φυσικό τρόπο, *in vivo*, επιβεβαιώνοντας τις

προηγούμενες παρατηρήσεις που είχαν όμως γίνει σε πρότυπα εργαστηριακά στελέχη, στα οποία η αντοχή και οι σχετικές μεταλλάξεις προέκυψαν με *in vitro* πειράματα. Επίσης, έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι ένα ColR στέλεχος συσχετίστηκε με παρατεταμένο αποικισμό χωρίς να προκαλεί σημεία λοίμωξης, σε αντίθεση με το αντίστοιχο ColS στέλεχος που προκάλεσε μικροβιαμίες (289). Στην περίπτωση των ασθενών μας ιδιαίτερη σημασία έχει ότι τα ColR στελέχη είχαν εμφανώς μειωμένη ικανότητα να προκαλούν διεισδυτική λοίμωξη, δεδομένου ότι οι ασθενείς παρέμειναν αποικισμένοι για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Αντίθετα, τα ομόλογα με τα ColR, ColS στελέχη που φέρονταν ταυτόχρονα από τους ίδιους ασθενείς, προκάλεσαν επανειλημμένα σοβαρές λοιμώξεις, μεταξύ των οποίων διαδοχικές μικροβιαμίες στην περίπτωση της πρώτης ασθενούς. Τονίζεται, επίσης, το γεγονός ότι ένα ColS στέλεχος, φαινοτυπικά όμοιο με τα υπόλοιπα ColS στελέχη της ίδιας ασθενούς, προκάλεσε και άλλο επεισόδιο μικροβιαμίας πολύ καιρό μετά τον αποικισμό της με τα ColR στελέχη.

Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα γνώσεις μας, δεν υπάρχουν μελέτες που να συγκρίνουν την επίδραση της αντοχής στην κολιστίνη στον σχηματισμό βιομεμβράνης μεταξύ κλινικών ColS/ColR στελεχών *A. baumannii*. Οι μόνες διαθέσιμες έρευνες μελετούν ColR μεταλλαγμένα στελέχη που παρήχθησαν *in vitro*, τα οποία παρήγαγαν λιγότερη βιομεμβράνη από τα ColS ομόλογα στελέχη τους (295, 300). Η μελέτη μας έδειξε ότι η απόκτηση της αντοχής στην κολιστίνη από τα δύο κλινικά στελέχη *A. baumannii* συσχετίστηκε με σημαντική απώλεια της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβράνης.

Από την ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος στα δύο παραπάνω ζεύγη προέκυψαν αρκετές αλλαγές στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Δεδομένου ότι οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα ColR στελέχη εντοπίστηκαν, κυρίως, σε γονίδια που επηρεάζουν τις ιδιότητες της επιφάνειας, οι αλλαγές στην αρχική προσκόλληση και ως εκ τούτου στη δυνατότητα σχηματισμού βιομεμβράνης είναι μάλλον αναμενόμενες. Επιπλέον, δεδομένης της μειωμένης ικανότητας ανάπτυξης των ColR στελεχών, που προέκυψε από τα πειράματα ανταγωνισμού, αυξάνει η πιθανότητα αυτός ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης να είναι η αιτία του μειωμένου σχηματισμού βιομεμβράνης στις πειραματικές δοκιμασίες. Από κλινική άποψη, η ελαττωμένη παραγωγή βιομεμβράνης και η μείωση της ικανότητας ανάπτυξης μπορεί να επηρεάσουν τη μολυσματικότητα και στην πραγματικότητα να διευκολύνουν τη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από ColR *A. baumannii*.

Όσον αφορά στις καρβαπενέμες, τα τελευταία χρόνια τα *A. baumannii* εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά αντοχής σε διάφορες περιοχές σε όλο τον κόσμο (207). Μάλιστα, είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό ότι τα ποσοστά αντοχής στις καρβαπενέμες φθάνουν ή

υπερβαίνουν το 90% σε χώρες της Νότιας και Ανατολικής Ευρώπης (281). Τα CRAB στελέχη είναι συνήθως ανθεκτικά στα περισσότερα διαθέσιμα αντιμικροβιακά, εκτός από την κολιστίνη, την τιγκεκυκλίνη ή τη μινοκυκλίνη (282, 342). Η παρακολούθηση της εξέλιξης και της κλωνικής σύνθεσης των CRAB στελεχών έχει ιδιαίτερη σημασία προκειμένου να μπορέσει να υποστηριχθεί η εφαρμογή των στρατηγικών ελέγχου των λοιμώξεων. Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες αποκαλύπτουν συνήθως κλωνικότητα των CRAB, καθώς έχει βρεθεί ότι τα επιδημικά στελέχη συνήθως ανήκουν στους διεθνείς κλώνους IC1 και IC2 (101).

Στα Ελληνικά νοσοκομεία, κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών *A. baumannii* είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (281) και αποτελούν το συχνότερο παθογόνο στη ΜΕΘ (<http://www.mednet.gr/whonet/>). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ουσιαστικά, κατά τη διάρκεια του 2015 στα Ελληνικά νοσοκομεία που συμμετείχαν στην πολυκεντρική μελέτη απομονώθηκαν σχεδόν αποκλειστικά (>95%) CRAB στελέχη. Αυτή η παρατηρούμενη σχεδόν καθολική αντοχή στις καρβαπενέμες, αλλά και στην αμικικιλίνη/σουλμπακτάμη, αποκλείει τη χρήση των β-λακταμών και περιορίζει σημαντικά τις αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές.

Η αντοχή στις καρβαπενέμες στα *A. baumannii* οφείλεται κυρίως στην παραγωγή των οξακιλλινασών, εκ των οποίων οι πιο συχνές είναι οι OXA-23, OXA-40 και OXA-58 (101). Τα OXA-23 ένζυμα εμφανίζουν μια ολοένα και μεγαλύτερη εξάπλωση τα τελευταία χρόνια και τείνουν να κυριαρχούν μεταξύ των CRAB σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές σε όλο τον κόσμο (223), αντικαθιστώντας βαθμιαία τα OXA-58 ένζυμα (218, 219, 343). Μια παρόμοια παρατήρηση προέκυψε και από την παρούσα εθνική μελέτη, όπου η καρβαπενεμάση OXA-23 ανιχνεύτηκε σχεδόν αποκλειστικά, εκτοπίζοντας την OXA-58, η οποία ήταν η μοναδική καρβαπενεμάση που απομονωνόταν μέχρι το 2009 μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* σε όλη την Ελλάδα (104). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η διεθνής στροφή προς την εξάπλωση των OXA-23 ενζύμων παρουσιάζεται, επίσης, και στη χώρα μας.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, τα στελέχη που ανήκουν στον κλώνο IC2 έχουν επεκταθεί ιδιαίτερα και σήμερα περιλαμβάνουν πλέον την πλειοψηφία των CRAB στελεχών παγκοσμίως (101, 344). Στη μελέτη μας, πολύ λίγοι κλώνοι φαίνεται να κυκλοφορούν στην Ελλάδα, με τον κλώνο IC2 να είναι ο συχνότερος. Μια παρόμοια τάση παρατηρήθηκε, επίσης, σε προηγούμενη εθνική μελέτη μας, η οποία είχε δείξει ότι ήδη μετά το 2005 ο κλώνος IC2 ήταν πιο διαδεδομένος στη χώρα μας σε σύγκριση με τον κλώνο IC1 (104).

Μεταξύ των λίγων αντιμικροβιακών που παρέμειναν δραστικά παρατηρήθηκαν ανησυχητικά υψηλά ποσοστά αντοχής (27,3%) για την κολιστίνη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι πρόσφατα η κολιστίνη θεωρούνταν σχεδόν πάντα δραστική έναντι των CRAB στελεχών και συνήθως περιλαμβανόταν στις συνδυαστικές θεραπείες (345). Η μινोकυκλίνη παρουσίασε σημαντικού βαθμού δραστικότητα (71,6%), συμβαδίζοντας με πρόσφατη παγκόσμια μελέτη επιτήρησης που έδειξε ποσοστά ευαισθησίας στη μινोकυκλίνη 66,2% και 62,9% έναντι MDR και XDR στελεχών *A. baumannii*, αντίστοιχα (282). Η τιγκεκυκλίνη, επίσης, διατήρησε ικανοποιητική δραστικότητα έναντι των Ελληνικών CRAB στελεχών, με MIC_{S50/90} ίσες με 1/2 µg/ml. Μετά την κολιστίνη, τη μινोकυκλίνη και την τιγκεκυκλίνη, αξίζει να σημειωθεί ότι η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη εμφανίστηκε δραστική στο 34,6% των CRAB στελεχών. Μάλιστα, αυτή η δραστικότητα της τριμεθοπρίμης/σουλφαμεθοξαζόλης παρατηρήθηκε κατά κύριο λόγο σε στελέχη που ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC2, παρά στον κλώνο IC1.

Συμπερασματικά, τα κύρια ευρήματα της παρούσας διατριβής όπως δημοσιεύτηκαν σε έγκυρα διεθνή ιατρικά περιοδικά είναι τα εξής:

- i) Οι συγκριτικές μελέτες αξιολόγησης των μεθόδων προσδιορισμού ευαισθησίας στην κολιστίνη έδειξαν σημαντικές δυσαρμονίες μεταξύ των μεθόδων. Οι ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού πρέπει να αποφεύγονται, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε ακατάλληλη θεραπεία με κολιστίνη (346, 347). Και τα αυτοματοποιημένα συστήματα υστερούν, καθώς μπορεί να οδηγήσουν, επίσης, σε ψευδώς ευαίσθητα αποτελέσματα. Τα κλινικά εργαστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούν τη μέθοδο αναφοράς, που είναι η μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη. Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν την ανάγκη για εντατική έρευνα με σκοπό να καθοριστεί η βέλτιστη μέθοδος προσδιορισμού ευαισθησίας στην κολιστίνη στα μικροβιολογικά εργαστήρια ρουτίνας.
- ii) Οι παρατηρήσεις στα δύο ζεύγη ColS/ColR κλινικών στελεχών *A. baumannii* έδειξαν σαφώς ότι οι αλλαγές που συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη προσδίδουν στα στελέχη σημαντικά μειωμένο ρυθμό μεταβολισμού/ανάπτυξης και επηρεάζουν την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιομεμβράνη και να προκαλούν κλινικές λοιμώξεις (348, 349). Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο σύνολο στελεχών είναι απαραίτητη για να διαλευκανθεί πλήρως η σχέση μεταξύ της αντοχής στην κολιστίνη και σχηματισμού βιομεμβράνης και των υποκείμενων μηχανισμών που ευθύνονται για αυτές τις εξελίξεις στα κλινικά στελέχη.
- iii) Τα αποτελέσματα της πολυκεντρικής μελέτης έδειξαν ότι τα CRAB στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις στα Ελληνικά νοσοκομεία παράγουν πλέον, σχεδόν αποκλειστικά, την

OXA-23 οξακιλλινάση και ανήκουν κυρίως στον διεθνή κλώνο IC2 και, σε μικρότερο βαθμό, στον κλώνο IC1 (350). Επί του παρόντος, υπάρχουν πολύ περιορισμένες θεραπευτικές εναλλακτικές επιλογές, ενώ ιδιαίτερα ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι η ευαισθησία στην κολιστίνη φαίνεται να μειώνεται σημαντικά. Συνεπώς, η προσεκτική εκτίμηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά τελευταίας εκλογής είναι υψίστης σημασίας. Τέλος, δεδομένης της έλλειψης νέων δραστικών αντιβιοτικών είναι αναγκαίο να διεξαχθούν περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* μελέτες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας παλιών, πολύτιμων αντιβιοτικών, όπως η μινοκυκλίνη και η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, έτσι ώστε να υποστηριχθεί η εισαγωγή τους στην κλινική πράξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, το *A. baumannii* αποτελεί τη συχνότερη αιτία λοιμώξεων στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας των Ελληνικών νοσοκομείων. Μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών, η Ελλάδα παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά μικροβιακής αντοχής του *A. baumannii* στις θεραπείες τελευταίας γραμμής, όπως οι καρβαπενέμες ή η κολιστίνη. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής και της δραστηριότητας των αντιβιοτικών τελευταίας εκλογής σε νοσοκομειακά στελέχη *A. baumannii*. Συνολικά μελετήθηκαν 216 πολυανθεκτικά και ανθεκτικά στις καρβαπενέμες κλινικά στελέχη *A. baumannii* (CRAB), τα οποία απομονώθηκαν κατά την περίοδο μεταξύ 2008 και 2015 από κλινικά δείγματα ασθενών διαφόρων νοσηλευτικών ιδρυμάτων της Βόρειας, Δυτικής, Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας.

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, αξιολογήθηκαν έξι μέθοδοι ευαισθησίας στην κολιστίνη σε 20 στελέχη *A. baumannii* με υψηλές τιμές MIC στην κολιστίνη, όπως καθορίστηκε από τον προκαταρκτικό έλεγχο ρουτίνας. Ο προσδιορισμός των MICs έγινε με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό (BMD), τη μέθοδο BMD με την προσθήκη 0.002% πολυσορβικού οξέος 80 (P80) (BMD-P80), τη μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ (AD), το αυτόματο σύστημα Vitek 2 και τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού Etest και MIC test strip (MTS). Ως μέθοδος αναφοράς για τη σύγκριση μεταξύ των μεθόδων χρησιμοποιήθηκε η BMD. Τα στελέχη με MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ ερμηνεύτηκαν ως ευαίσθητα, ενώ αυτά με MIC >2 $\mu\text{g/ml}$ ως ανθεκτικά. Τα ποσοστά των ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών ήταν 90% με τη μέθοδο BMD, 60% με τη BMD-P80, 90% με την AD, 55% με το Etest, 65% με το MTS και 100% με το Vitek 2. Οι μέθοδοι Etest και MTS παρήγαγαν υπερβολικά ποσοστά ψευδώς ευαίσθητων αποτελεσμάτων (VMEs) (35και 25%, αντίστοιχα). Η μέθοδος BMD-P80 απέδωσε 30% VMEs, η AD 10% VMEs, ενώ το Vitek 2 δεν παρήγαγε VMEs. Τα ψευδώς ανθεκτικά αποτελέσματα (MEs) ήταν περιορισμένα με όλες τις μεθόδους. Σε επόμενη φάση, αξιολογήσαμε τα αυτοματοποιημένα συστήματα Vitek 2 και Phoenix100 και τη μέθοδο AD σε σύγκριση με τη μέθοδο BMD για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιστίνη, σε μία συλλογή από 117 τυχαία επιλεγμένα στελέχη *A. baumannii*. Τα ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη με τις μεθόδους Phoenix100/Vitek 2/AD/BMD ήταν 15,4/16,2/35,9/24,8%, αντίστοιχα. Τα ποσοστά των VMEs/MEs ήταν τα εξής: 41,4/1,1% για το Phoenix100, 37,9/1,1% για το Vitek 2 και 3,4/15,9% για την AD. Συνολικά, τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι οι μέθοδοι κλιμακωτής διάχυσης και τα αυτοματοποιημένα συστήματα υποεκτίμησαν σημαντικά την

αντοχή στην κολιστίνη, και ως εκ τούτου, μπορεί να οδηγήσουν σε ακατάλληλη θεραπεία με κολιστίνη. Τα ευαίσθητα στελέχη με τις εμπορικές μεθόδους και ιδιαίτερα αυτά με MIC στο όριο ευαισθησίας (2 µg/ml) πρέπει να επικυρώνονται με την πρότυπη μέθοδο BMD.

Στο επόμενο στάδιο της μελέτης, διερευνήθηκαν φαινοτυπικές, γενωμικές και παθογενετικές μεταβολές που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη *in vivo*. Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκαν τα χαρακτηριστικά και οι μηχανισμοί της αντοχής στην κολιστίνη σε δύο ζεύγη γενετικά σχετιζόμενων μεταξύ τους ευαίσθητων στην κολιστίνη/ανθεκτικών στην κολιστίνη (ColS/ColR) κλινικών στελεχών *A. baumannii* (Ab299/Ab347, MIC: 0.5/32 µg/ml και Ab248/Ab249, MIC: 0.5/128 µg/ml). Τα στελέχη απομονώθηκαν διαδοχικά από τα κλινικά δείγματα δύο ασθενών κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους στη ΜΕΘ, ενώ μεταξύ των απομονώσεων των ColS και ColR στελεχών οι ασθενείς έλαβαν κολιστίνη για αρκετές ημέρες. Μεταξύ των ColS/ColR στελεχών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους φαινοτύπους αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά, εκτός από την κολιστίνη. Τα ColS στελέχη του πρώτου ζεύγους προκάλεσαν διαδοχικές βακτηραιμίες και του δεύτερου ζεύγους σοβαρή λοίμωξη μαλακών μορίων, ενώ τα αντίστοιχα ColR στελέχη και στα δύο ζεύγη ήταν κυρίως αποικιστές. Τα ColS/ColR στελέχη εντός του κάθε ζεύγους ήταν γενετικά ταυτόσημα μεταξύ τους με την PFGE και ανήκαν με την MLST στον επικρατούντα παγκοσμίως διεθνή κλώνο IC2. Σε σύγκριση με τα ColS, τα ColR στελέχη εμφάνισαν σημαντική υπερέκφραση των γονιδίων *pmrCAB* και είχαν μονήρεις μεταλλάξεις αμινοξέων στην πρωτεΐνη PmrB. Τα ColR στελέχη έδειξαν σημαντικά πιο αργή ανάπτυξη και σχετική ικανότητα ανάπτυξης ($P < 0.05$), όπως και σημαντικά μειωμένη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης στη στατική και δυναμική δοκιμασία ($P < 0.001$) σε σύγκριση με τα ομόλογά τους ColS στελέχη. Η συγκριτική ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος μεταξύ των στελεχών του κάθε ζεύγους ανίχνευσε στο ColR στέλεχος Ab249 μια μετάλλαξη μετατροπής ενός κωδικονίου τερματισμού σε λυσίνη (*241K) στην πρωτεΐνη LpsB, η οποία συμμετέχει στη σύνθεση του λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος. Στο ColR στέλεχος Ab347 ανιχνεύτηκε μια μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου στην πρωτεΐνη CarO και η απώλεια μιας περιοχής 47.969-bp, η οποία περιείχε πολλαπλά γονίδια που συνδέονται με την παραγωγή βιομεμβράνης. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η παρατεταμένη θεραπεία με κολιστίνη οδήγησε στην επιλογή ανθεκτικών στην κολιστίνη κλινικών στελεχών *A. baumannii*, τα οποία φάνηκε ότι απέκτησαν και εκδήλωσαν σημαντικά μειωμένη μολυσματικότητα σε σύγκριση με τα ευαίσθητα.

Στο τελευταίο στάδιο της μελέτης, ερευνήσαμε την αντοχή στα αντιβιοτικά, τα γονίδια καρβαπενεμασών και την κλωνική συγγένεια 194 κλινικών στελεχών CRAB, τα οποία συλλέχθηκαν τυχαία κατά τη διάρκεια του 2015 από 11 τριτοβάθμια νοσοκομεία σε όλη την Ελλάδα. Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά χρησιμοποιήθηκαν εμπορικές και πρότυπες μέθοδοι. Η ανίχνευση των καρβαπενεμασών έγινε με PCR. Η κλωνικότητα ελέγχθηκε με το σχήμα που βασίζεται σε δύο multiplex PCRs και τη μέθοδο αλληλούχησης του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like}, ενώ οι μέθοδοι MLST (σχήμα Pasteur) και PFGE εφαρμόστηκαν σε 31 αντιπροσωπευτικά στελέχη. Τα πιο δραστικά αντιβιοτικά ήταν η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (34,6% των στελεχών ήταν ευαίσθητα), η μινοκυκλίνη (71,6%), η κολιστίνη (72,7%) και η τιγκεκυκλίνη (MIC_{S50/90}, 1/2 μg/ml). Το γονίδιο *bla*_{OXA-23-like} ανιχνεύτηκε σε 188 στελέχη (96,9%) και μαζί με το *bla*_{OXA-58-like} σε 3 ακόμη στελέχη. Το γονίδιο *bla*_{OXA-58-like} ανιχνεύτηκε σε 2 στελέχη και το γονίδιο *bla*_{OXA-40-like} σε 1 στέλεχος. Η αλληλουχία εισδοχής *ISAbal* βρέθηκε στην ανωφέρεια του γονιδίου *bla*_{OXA-23-like} σε όλα τα στελέχη. Τα αποτελέσματα τυποποίησης έδειξαν ότι 157 στελέχη (80,9%) ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC2 και τον MLST τύπο ST2 και 36 στελέχη (18,6%) ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC1 και τον τύπο ST1. Το στέλεχος που έφερε το γονίδιο *bla*_{OXA-40-like} ανήκε στον τύπο ST78, ο οποίος για πρώτη φορά ανιχνεύτηκε στη χώρα μας. Με τη μέθοδο PFGE ταυτοποιήθηκαν επτά διαφορετικοί κλώνοι. Τα στελέχη που ανήκαν στον κλώνο IC2 ήταν ανθεκτικά σε περισσότερα αντιβιοτικά σε σχέση με τα στελέχη που ανήκαν στον κλώνο IC1, εκτός από την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη. Συνολικά, αυτή η εθνική μελέτη έδειξε ότι τα CRAB στελέχη στα Ελληνικά νοσοκομεία σήμερα παράγουν, σχεδόν αποκλειστικά, την καρβαπενεμάση OXA-23 και ανήκουν κυρίως στον κλώνο IC2 και σε μικρότερο βαθμό στον IC1. Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η πρόσφατη ελάττωση της ευαισθησίας στην κολιστίνη στην χώρα μας.

ABSTRACT

During the last years, *A. baumannii* is the most frequent pathogen causing infections in Intensive Care Units of Greek hospitals. Among European countries, Greece presents the most remarkable rates of antimicrobial resistance of *A. baumannii* to the last line treatment alternatives, such as carbapenems or colistin. The aim of the current thesis was to investigate the resistance mechanisms and the activity of the last line antibiotics in hospital acquired isolates of *A. baumannii*. A total of 216 multidrug-resistant and carbapenem resistant *A. baumannii* (CRAB) clinical isolates, which were isolated from clinical specimens of patients of various hospitals in Northern, Western, Central and Southern Greece in the period between 2008 and 2015 were studied.

At the first stage of the study, we evaluated six colistin susceptibility testing (ST) methods on 20 *A. baumannii* isolates with provisionally elevated colistin MICs by routine ST. Colistin MICs were determined by broth microdilution (BMD), BMD with 0.002% polysorbate 80 (P80) (BMD-P80), agar dilution (AD), the automated system Vitek 2, and the gradient tests Etest and MIC test strip (MTS). BMD was used as the reference method for comparison. Isolates with MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ were interpreted as susceptible, while those with MIC > 2 $\mu\text{g/ml}$ as resistant. The proportions of colistin resistant isolates were 90, 60, 90, 55, 65, and 100% by BMD, BMD-P80, AD, Etest, MTS, and Vitek 2, respectively. The Etest and MTS methods produced excessive rates of false susceptible results (VMEs) (35 and 25%, respectively), while BMD-P80 produced 30% VMEs, AD produced 10% VMEs, and Vitek 2 produced no VMEs. False resistant results (MEs) were rather limited by all tested methods. At next phase, we evaluated Vitek 2 and Phoenix100 automated systems and AD compared with BMD for colistin ST against 117 randomly selected *A. baumannii* isolates. Colistin resistance rates were: Phoenix100/Vitek 2/AD/BMD, 15.4/16.2/35.9/24.8%; VMEs/MEs: Phoenix100 41.4/1.1%, Vitek 2 37.9/1.1%, AD 3.4/15.9%. Overall, these data show that the gradient diffusion methods and automated systems significantly underestimated the resistance to colistin and may lead to inappropriate colistin therapy. The susceptible isolates, particularly those with MIC on the breakpoint of 2 $\mu\text{g/ml}$ with commercial methods, require validation by the standard method BMD.

At the next stage of the study, phenotypic, genomic and pathogenetic changes associated with the development of resistance to colistin *in vivo* were investigated. In this study, we

investigated the characteristics and the mechanisms of colistin resistance in two genetically indistinguishable with each other colistin-susceptible/colistin-resistant (ColS/ColR) pairs of *A. baumannii* clinical isolates (Ab299/Ab347 and Ab248/Ab249; colistin MICs of 0.5/32 and 0.5/128 µg/ml, respectively). The isolates were successively recovered from clinical specimens of two patients during their hospitalization in ICU, while between ColS/ColR isolations the patients received colistin for several days. Important differences in the antibiotic resistance phenotypes other than colistin were not observed among ColS/ColR isolates. The ColS isolates of the first pair caused sequential bloodstream infections and the ColS isolates of the second pair a severe soft tissue infection, while the respective ColR isolates were mainly colonizers. The ColS/ColR isolates of each pair were genetically indistinguishable by PFGE and were assigned by MLST to the worldwide predominant international clone (IC) 2. Compared with the ColS, the ColR isolates overexpressed significantly the *pmrCAB* genes and had single aminoacid shifts in PmrB protein. The ColR isolates showed significantly slower growth and relative fitness ($P < 0.05$), as well as significantly decreased biofilm formation in static and dynamic assays ($P < 0.001$) compared with those of the ColS counterparts. The whole-genome sequencing comparison of strain pairs identified a mutation converting a stop codon to lysine (*241K) in LpsB (involved in lipopolysaccharide synthesis) in the ColR isolate Ab249 and a frameshift mutation in CarO and the loss of a 47,969-bp element containing multiple genes associated with biofilm production in the ColR isolate Ab347. These findings overall indicate that prolonged colistin treatment contributed to the selection of ColR *A. baumannii* clinical isolates, which acquired and exhibited considerably lower infectivity than the susceptible ones.

During the last stage of the study, we investigated the antibiotic resistances, carbapenemase gene content and clonal relatedness of 194 single-patient CRAB clinical isolates collected randomly during 2015 from 11 tertiary hospitals throughout Greece. Antimicrobial susceptibilities were determined using commercial and standard methods. PCR assays for carbapenemase genes were performed. Clonality was tested by the scheme based on two multiplex PCRs and the single-locus *bla*_{OXA-51-like} sequence-based typing; Pasteur's MLST and PFGE were applied to 31 selected representative isolates. The most active antibiotics were trimethoprim/sulfamethoxazole (34.6% of isolates susceptible), minocycline (71.6%), colistin (72.7%) and tigecycline (MIC_{S50/90}, 1/2 µg/ml). The *bla*_{OXA-23-like} gene was identified in 188 (96.9%) and along with *bla*_{OXA-58-like} in 3 more isolates, *bla*_{OXA-58-like} in 2 and *bla*_{OXA-40-like} in 1 isolate; *ISAbal* preceded the *bla*_{OXA-23-like} in all isolates. The typing results showed

that 157 isolates (80.9%) belonged to the international clone IC2 and MLST type ST2 and 36 isolates (18.6%) assigned to IC1 and MLST type ST1. The isolate carried the *bla*_{OXA-40-like} gene assigned to ST78, which was detected for first time in our country. Seven PFGE types were detected. The IC2 isolates were resistant to more antibiotics than IC1 isolates, except trimethoprim/sulfamethoxazole. In summary, this nationwide study showed that CRAB isolates in Greek hospitals currently produce almost exclusively the OXA-23 carbapenemase and belong mainly to IC2 and, to a lesser extent to IC1. Of particular concern is the recent reduction of colistin susceptibility in our country.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect. 2005;11(11):868–73.
2. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev. 2017;30(1):409–47.
3. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol. 2012;3:148.
4. Imperi F, Antunes LCS, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P, *et al.* The genomics of *Acinetobacter baumannii*: Insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. IUBMB Life. 2011;63(12):1068–74.
5. Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: Clinical impact and therapeutic options. Int J Antimicrob Agents. 2012;39(2):105–14.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: ECDC; 2015.
7. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1607–15.
8. Viale P, Giannella M, Tedeschi S, Lewis R. Treatment of MDR-Gram negative infections in the 21st century: a never ending threat for clinicians. Curr Opin Pharmacol. 2015;24:30–7.
9. Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. Future Microbiol. 2011;6(4):407–22.
10. Brisou J, Prevot A. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. Ann Inst Pasteur. 1954;86(6):722–8.
11. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol. 1968;95(5):1520–41.
12. Peleg AY, de Breij A, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, *et al.* The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. PLoS One. 2012;7(10):e46984.
13. Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, Kerrinnes T, Faber F, Lepka D, *et al.* Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. Int J Med Microbiol. 2012;302(3):117–28.
14. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):538–82.
15. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection - An emerging threat to human health. IUBMB Life. 2011;63(12):1048–54.
16. Vaneechoutte M, De Baere T, Nemec A, Musilek M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. Reclassification of *Acinetobacter grimontii* Carr *et al.* 2003 as a later synonym of *Acinetobacter junii* Bouvet and Grimont 1986. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58(4):937–40.
17. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS. 1989;(24):595–605.
18. Nemec A, Musilek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerová M, van der Reijden TJ, *et al.* *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate

- Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(4):896–903.
19. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res Microbiol. 2011;162(4):393–404.
 20. Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemec A. *Acinetobacter albensis* sp. Nov., isolated from natural soil and water ecosystems. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(11):3905–12.
 21. Kim PS, Shin NR, Kim JY, Yun JH, Hyun DW, Bae JW. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. J Microbiol. 2014;52(8):639–45.
 22. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol. 1986;36(2):228–40.
 23. Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53(4):953–63.
 24. Nemec A, Musílek M, Maixnerová M, De Baere T, van der Reijden TJ, Vannechoutte M, *et al.* *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59(1):118–24.
 25. Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemec A. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. Syst Appl Microbiol. 2014;37(7):467–73.
 26. Álvarez-Pérez S, Lievens B, Jacquemyn H, Herrera CM. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:1532–9.
 27. Anandham R, Weon HY, Kim SJ, Kim YS, Kim BY, Kwon SW. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. J Microbiol. 2010;48(1):36–9.
 28. Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Nemec A. *Acinetobacter celticus* sp. nov., a psychrotolerant species widespread in natural soil and water ecosystems. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5392–8.
 29. Nemec A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Vrestiakova E, Jezek P, Sedo O. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 *sensu* Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(4):1673–85.
 30. Bouvet PJM, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol. 1989;140(4):291–9.
 31. Cosgaya C, Mari-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, *et al.* *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(10):4105–11.
 32. Poppel M, Skiebe E, Laue M, Bergmann H, Ebersberger I, Garn T, *et al.* *Acinetobacter equi* sp. nov. isolated from horse faeces. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66:881–8.
 33. Smet A, Cools P, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Haesebrouck F, *et al.* *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64:4007–15.

34. Feng GD, Yang SZ, Wang YH, Deng MR, Zhu HH. *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64:3417–21.
35. Li W, Zhang D, Huang X, Qin W. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64:1507–13.
36. Malhotra J, Anand S, Jindal S, Rajagopal R, Lal R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62(12):2883–90.
37. Choi JY, Ko G, Jheong W, Huys G, Seifert H, Dijkshoorn L, *et al.* *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:4402–6.
38. Rooney A, Dunlap C, Flor-Weiler L. *Acinetobacter lactucae* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (Asteraceae: *Lactuca sativa*). Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(9):3566–72.
39. Touchon M, Cury J, Yoon EJ, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, *et al.* The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. Genome Biol Evol. 2014;6(10):2866–82.
40. Abbas S, Ahmed I, Kudo T, Iida T, Ali GM, Fujiwara T, *et al.* Heavy metal-tolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov., isolated from a textile dyeing wastewater treatment pond. Pak J Agri Sci. 2014;51(3):595–608.
41. Nemec A, Radolfova-Krizova L. *Acinetobacter pakistanensis* Abbas *et al.* 2014 is a later heterotypic synonym of *Acinetobacter bohemicus* Krizova *et al.* 2014. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5614–7.
42. Nemec A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, van der Reijden TJK, *et al.* *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53(5):1563–7.
43. Li Y, Chang J, Guo L, Wang H, Xie S, Piao C, *et al.* Description of *Acinetobacter populi* sp. nov. isolated from symptomatic bark of Populus x euramericana canker. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(12):4461–8.
44. Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Nemec A. *Acinetobacter pragensis* sp. nov., found in soil and water ecosystems. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(10):3897–903.
45. Li Y, Piao CG, Ma YC, He W, Wang HM, Chang JP, *et al.* *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of Populus x euramericana canker bark. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:2963–9.
46. Li Y, He W, Wang T, Piao CG, Guo LM, Chang JP, *et al.* *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of Populus x euramericana. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64:1043–50.
47. Nishimura Y, Ino T, Iizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. Int J Syst Bacteriol. 1988;38(2):209–11.
48. Vaz-Moreira I, Novo A, Hantsis-Zacharov E, Lopes AR, Gomila M, Nunes OC, *et al.* *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61(12):2837–43.
49. Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51:1891–9.
50. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(3):934–42.
51. Gerner-Smidt P, Tjernberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. APMIS. 1993;10(11):826–32.

52. Kim D, Baik KS, Kim MS, Park SC, Kim SS, Rhee MS, *et al.* *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. J Microbiol. 2008;46(4):396–401.
53. Krizova L, McGinnis J, Maixnerova M, Nemec M, Poire L, Mingle L, *et al.* *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 *sensu* Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65(3):857–63.
54. Vaneechoutte M, Nemec A, Musilek M, van der Reijden TJ, van den Barselaar M, Tjernberg I, *et al.* Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello *et al.* 1997 sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009;59(6):1376–81.
55. Di Cello F, Pepi M, Baldi F, Fani R. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. Res Microbiol. 1997;148(3):237–49.
56. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol. 2007;5(12):939–51.
57. Koh TH, Tan TT, Khoo CT, Ng SY, Tan TY, Hsu LY, *et al.* *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex species in clinical specimens in Singapore. Epidemiol Infect. 2012;140(3):535–8.
58. Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. J Antimicrob Chemother. 2011;66(4):738–44.
59. Kishii K, Kikuchi K, Tomida J, Kawamura Y, Yoshida A, Okuzumi K, *et al.* The first cases of human bacteremia caused by *Acinetobacter seifertii* in Japan. J Infect Chemother. 2016;22(5):342–5.
60. Yang Y, Wang J, Fu Y, Ruan Z, Yu Y. *Acinetobacter seifertii* Isolated from China: Genomic Sequence and Molecular Epidemiology Analyses. Medicine (Baltimore). 2016;95(9):e2937.
61. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J Clin Microbiol. 1997;35(11):2819–25.
62. Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, *et al.* Skin carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. J Clin Microbiol. 1999;37(9):2962–7.
63. Hamouda A, Findlay J, Al Hassan L, Amyes SG. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. Int J Antimicrob Agents. 2011;38(4):314–8.
64. Dijkshoorn L, Van Vianen W, Degener JE, Michel MF. Typing of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated from hospital patients by cell envelope protein profiles. Epidemiol Infect. 1987;99(3):659–67.
65. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, *et al.* Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999–2001. Clin Microbiol Infect. 2006;12(9):837–43.
66. Bernards AT, Harinck H, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, van den Broek PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004;25(11):995–7.
67. Bernards AT, Frénay HM, Lim BT, Hendriks WD, Dijkshoorn L, Van Boven CP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*: an unexpected difference in epidemiologic behavior. Am J Infect Control. 1998;26:544–51.
68. Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H, *et al.* Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. PLoS One. 2014;9(8):e104882.
69. Lee MJ, Jang SJ, Li XM, Park G, Kook JK, Kim MJ, *et al.* Comparison of *rpoB* gene sequencing,

- 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(1):29–34.
70. Chuang YC, Sheng WH, Li SY, Lin YC, Wang JT, Chen YC, *et al*. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):352–60.
 71. Lim YM, Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):902–5.
 72. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(11):1097–103.
 73. Pailhories H, Daure S, Eveillard M, Joly-Guillou ML, Kempf M. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex: A relevant alternative to molecular biology? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(2):99–104.
 74. Álvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. Identification of *Acinetobacter* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):345–9.
 75. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987;138(5):569–78.
 76. Claey's G, Verschraegen G, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. 1995;33(1):11–5.
 77. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, *et al*. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47(4):1179–87.
 78. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol*. 1992;30(10):2680–85.
 79. Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ, *et al*. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 1996;34(10):2414–20.
 80. Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus-A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1108–13.
 81. Vaneechoutte M, Young DM, Ornston LN, De Baere T, Nemec A, Van Der Reijden T, *et al*. Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(1):932–6.
 82. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Society*. 2005;43(4):1632–9.
 83. Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol Cell Probes*. 2002;16:1–11.
 84. Yamamoto S, Bouvet PJM, Harayama S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49(1):87–95.
 85. La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):827–32.

86. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974–6.
87. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(12):1200–1.
88. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J Clin Microbiol*. 2010;48(12):4592–4.
89. Gundi VA, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*. 2009;155(7):2333–41.
90. Zander E, Higgins PG, Fernández-González A, Seifert H. Detection of intrinsic *bla*_{OXA-51-like} by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(2):88–9.
91. Lee YT, Turton JF, Chen TL, Wu RC, Chang WC, Fung CP, *et al*. First identification of *bla*_{OXA-51-like} in Non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. *J Chemother*. 2009;21(5):514–20.
92. Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, Yang SP, Chen CP, Chen TL, *et al*. Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a *bla*_{OXA-51-like} gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):1124–7.
93. Ruan Z, Chen Y, Jiang Y, Zhou H, Zhou Z, Fu Y, *et al*. Wide distribution of CC92 carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in multiple provinces of China. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(4):322–8.
94. Houang ET, Sormunen RT, Lai L, Chan CY, Leong AS. Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter lwoffii*. *J Clin Pathol*. 1998;51(10):786–8.
95. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006;42(5):657–68.
96. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013.
97. Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care*. 2007;11(3):134.
98. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, *et al*. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis*. 2007;44(12):1577–84.
99. Petersen K, Cannegieter SC, Van Der Reijden TJ, Van Strijen B, You DM, Babel BS, *et al*. Diversity and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection at a military medical center. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):159–66.
100. Maegele M, Gregor S, Steinhäuser E, Bouillon B, Heiss MM, Perbix W, *et al*. The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: Injury pattern and microbiological and psychological aspects. *Crit Care Med*. 2005;33(5):1136–40.
101. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(1):11–9.
102. Chang KM, Huang WC, Chiou CS, Shen GH, Huang CC, Wen FS. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of

- Acinetobacter baumannii*. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(3):195–201.
103. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Van Der Reijden T, Van Strijen B, Stefanik D, *et al*. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005;43(9):4328–35.
 104. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, *et al*. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: A 10 year study in Greece (2000-09). J Antimicrob Chemother. 2011;66(12):2767–72.
 105. Park YS, Lee H, Lee KS, Hwang SS, Cho YK, Kim HY, *et al*. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multicentre study. Int J Antimicrob Agents. 2010;36(5):430–5.
 106. Liu PY, Wu WL. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997;29(1):19–28.
 107. Lambiase A, Piazza O, Rossano F, Del Pezzo M, Tufano R, Catania MR. Persistence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. New Microbiol. 2012;35(2):199–206.
 108. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al*. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233–39.
 109. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, *et al*. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996;34(6):1519–25.
 110. Turton JF, Matos J, Kaufmann ME, Pitt TL. Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(5):499–507.
 111. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y, D'Arezzo S, Imperi F, Vergnaud G, *et al*. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J Clin Microbiol. 2011;49(2):539–48.
 112. Minandri F, D'Arezzo S, Antunes LCS, Pourcel C, Principe L, Petrosillo N, *et al*. Evidence of diversity among epidemiologically related carbapenemase- producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to international clonal lineage II. J Clin Microbiol. 2012;50(3):590–7.
 113. Carretto E, Barbarini D, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, Brisse S, Passet V, *et al*. Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. Infect Genet Evol. 2011;11(6):1319–26.
 114. Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG. Association between β -lactamase-encoding *bla*_{OXA-51} variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. J Clin Microbiol. 2012;50(6):1900–4.
 115. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes. J Clin Microbiol. 2010;48(7):2476–83.
 116. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006;12(9):826–36.
 117. Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):241–63.
 118. Evans BA, Hamouda A, Towner KJ, Amyes SG. OXA-51-like beta-lactamases and their

- association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2008;14(3):268–75.
119. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, Dimitroulia E, Dafopoulou K, Tsakris A, *et al.* Single-locus-sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1653–7.
 120. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2007;13(8):807–15.
 121. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. J Antimicrob Chemother. 2009;63(4):828–30.
 122. Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1223–30.
 123. Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M, Joly-Guillou ML. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. Future Microbiol. 2014;9(10):1179–94.
 124. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2005;43(9):4382–90.
 125. Wisplinghoff H, Hippler C, Bartual SG, Haefs C, Stefanik D, Higgins PG, *et al.* Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. Clin Microbiol Infect. 2008;14(7):708–15.
 126. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS One. 2010;5(4):e10034.
 127. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. J Clin Microbiol. 2011;49(11):3849–54.
 128. Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, *et al.* OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: A new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? J Antimicrob Chemother. 2011;66(1):62–5.
 129. Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Raghildstveit E, Skutlaberg DH, *et al.* Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. J Med Microbiol. 2011;60(4):515–21.
 130. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. PLoS One. 2016;11(4):e0153014.
 131. Ecker JA, Massire C, Hall TA, Ranken R, Pennella TT, Agasino Ivy C, *et al.* Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2921–32.
 132. Decker BK, Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Hall GS, Jacobs MR, *et al.* Longitudinal analysis of the temporal evolution of *Acinetobacter baumannii* strains in Ohio, USA, by using rapid automated typing methods. PLoS One. 2012;7(4):e33443.
 133. Lewis T, Loman NJ, Bingle L, Jumaa P, Weinstock GM, Mortiboy D, *et al.* High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. J Hosp Infect. 2010;75(1):37–41.

134. Snitkin E, Zelazny A, Montero C, Stock F, Mijares L, Murray P, *et al.* Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(33):13758–63.
135. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, *et al.* New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio.* 2014;5(1):e00963-13.
136. Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND, Bonomo RA. Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3569–77.
137. Di Nocera PP, Rocco F, Giannouli M, Triassi M, Zarrilli R. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol.* 2011;11:224.
138. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, *et al.* Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2008;190(24):8053–64.
139. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 5.0. EUCAST Laboratory for Antimicrobial Susceptibility Testing, Växjö, Sweden; 2015. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
140. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015.
141. Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5102–8.
142. Winstanley T, Courvalin P. Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):515–56.
143. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. *In vitro* activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(5):1586–92.
144. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2014.
145. Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. *BMC Infect Dis.* 2009;9:30.
146. Markelz AE, Mende K, Murray CK, Yu X, Zera WC, Hospenthal DR, *et al.* Carbapenem susceptibility testing errors using three automated systems, disk diffusion, etest, and broth microdilution and carbapenem resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4707–11.
147. Aybey AD, Aksit F, Oz Y, Kiremitci A, Durmaz G. Evaluation of an automated system for the detection of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* and assessment of metallo- β -lactamase production using two different phenotyping methods. *J Microbiol Methods.* 2011;86(1):121–3.
148. Hsieh WS, Sung LL, Tsai KC, Ho HT. Evaluation of the VITEK 2 cards for identification and antimicrobial susceptibility testing of non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli. *Apmis.* 2009;117(4):241–7.
149. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility

- Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):183–90.
150. Tan TY, Ng LSY. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(4):864–7.
 151. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3726–30.
 152. Arroyo L, García-Curiel A, Pachón-Ibañez M, Llanos A, Ruiz M, Pachón J, *et al*. Reliability of the E-Test Method for Detection of Colistin Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):903–5.
 153. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, *et al*. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1924–6.
 154. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 2013;51(6):1678–84.
 155. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(5):541–4.
 156. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, *et al*. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: The Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(2):225–34.
 157. Albur M, Noel A, Bowker K, MacGowan A. Colistin susceptibility testing: Time for a review. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(5):1432–4.
 158. Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(4):412–4.
 159. Sutherland CA, Nicolau DP. To add or not to add Polysorbate 80: Impact on colistin MICs for clinical strains of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa and quality controls. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3810.
 160. Turnidge J. Susceptibility testing issues with old antibiotics. Presented at: ESCMID Conference on Reviving Old Antibiotics; Vienna, Austria; 22 - 24 October 2014.
 161. Jerke KH, Lee MJ, Humphries RM. Polymyxin Susceptibility Testing: A Cold Case Reopened. *Clin Microbiol Newsl*. 2016;38(9):69–77.
 162. Thamlikitkul V, Tiengrim S, Tribuddharat C. Comment on: High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(1):177–8.
 163. Thamlikitkul V, Tiengrim S. Effect of different Mueller-Hinton agars on tigecycline disc diffusion susceptibility for *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(4):847–8.
 164. Canigia LF, Bantar C. Susceptibility testing of tigecycline against *Acinetobacter* spp. by disc diffusion method: Withdrawing a therapeutic option by varying the Mueller-Hinton agar? *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1463–4.
 165. Pillar CM, Draghi DC, Dowzicky MJ, Sahm DF. *In vitro* activity of tigecycline against gram-positive and gram-negative pathogens as evaluated by broth microdilution and Etest. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):2862–7.
 166. Kulah C, Celebi G, Aktas E, Mengeloglu Z, Comert F, Ankarali H. Unexpected tigecycline resistance among *Acinetobacter baumannii* Isolates: high minor error rate by Etest. *J Chemother*.

- 2009;21(4):390–5.
167. Grandesso S, Sapino B, Amici G, Mazzucato S, Solinas M, Gion M. Are E-test and Vitek2 good choices for tigecycline susceptibility testing when comparing broth microdilution for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii*? New Microbiol. 2014;37(4):503–8.
 168. Casal M, Rodríguez F, Johnson B, Garduno E, Tubau F, de Lejarazu RO, *et al.* Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother. 2009;64(1):69–72.
 169. Marchaim D, Pogue JM, Tzuman O, Hayakawa K, Lephart PR, Salimnia H, *et al.* Major variation in MICs of tigecycline in Gram-negative bacilli as a function of testing method. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1617–21.
 170. Fernández-Mazarrasa C, Mazarrasa O, Calvo J, Del Arco A, Martínez-Martínez L. High concentrations of manganese in mueller-hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. J Clin Microbiol. 2009;47(3):827–9.
 171. Zarkotou O, Pournaras S, Altouvas G, Pitiriga V, Tziraki M, Mamali V, *et al.* Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant gram-negative pathogens. J Clin Microbiol. 2012;50(11):3747–50.
 172. Zárate MS, Serruto G, Smayevsky J. The susceptibility to tigecycline of *Acinetobacter* spp. may vary depending on the methodology used. Int J Infect Dis. 2010;14 Suppl 3:e351–2.
 173. Qu J, Zong Z, Yu R, Hu T, Ye H, Lü X. Impact of test methodology, media type and ion content on the susceptibility of *Acinetobacter* spp. to tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2014;69(6):1710–1.
 174. Hope R, Warner M, Mushtaq S, Ward ME, Parsons T, Livermore DM. Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. J Antimicrob Chemother. 2005;56(6):1042–6.
 175. Bradford PA, Petersen PJ, Young M, Jones CH, Tischler M, O’Connell J. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(9):3903–9.
 176. Castanheira M, Mendes RE, Jones RN. Update on *Acinetobacter* species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary *in vitro* activity of minocycline and other treatment options. Clin Infect Dis. 2014;59 Suppl 6:S367-73.
 177. Dimitriadis P, Protonotariou E, Varlamis S, Poulou A, Vasilaki O, Metallidis S, *et al.* Comparative evaluation of minocycline susceptibility testing methods in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 2016;48(3):321–3.
 178. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. IUBMB Life. 2011;63(12):1055–60.
 179. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(2):130–55.
 180. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology. 2003;149(12):3473–84.
 181. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. Microbiology. 2008;154(11):3398–409.
 182. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. J Bacteriol. 2008;190(3):1036–44.
 183. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter*

- baumannii* encodes the production of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. J Bacteriol. 2009;191(19):5953–63.
184. Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C, *et al.* Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. PLoS Pathog. 2012;8(6).
 185. Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol. 2008;190(9):3386–92.
 186. Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litrán T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol. 2012;194(15):3950–60.
 187. Cabral MP, Soares NC, Aranda J, Parreira JR, Rumbo C, Poza M, *et al.* Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for *Acinetobacter baumannii* biofilms and a key role for histidine metabolism. J Proteome Res. 2011;10(8):3399–417.
 188. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol. 2005;7(8):1127–38.
 189. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun. 2009;77(8):3150–60.
 190. Abbott I, Cerqueira GM, Bhuiyan S, Peleg AY. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(4):395–409.
 191. Russo TA, Macdonald U, Beanan JM, Olson R, Macdonald IJ, Sauberman SL, *et al.* Penicillin-Binding Protein 7/8 Contributes to the Survival of *Acinetobacter baumannii* *In Vitro* and *In Vivo*. 2009;199:513–21.
 192. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, *et al.* Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect Immun. 2010;78(5):1952–62.
 193. Luke NR, Sauberman SL, Russo TA, Beanan JM, Olson R, Loehfelm TW, *et al.* Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. Infect Immun. 2010;78(5):2017–23.
 194. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberman SL, MacDonald U, *et al.* The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect Immun. 2010;78(9):3993–4000.
 195. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS One. 2011;6(8):e22674.
 196. Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS Microbiol Lett. 2011;323(1):44–51.
 197. Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P, Zarrilli R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. BMC Infect Dis. 2013;13:282.
 198. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, *et al.* Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. Res Microbiol. 2006;157(4):360–6.

199. de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, *et al.* Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? PLoS One. 2010;5(5): e10732.
200. Sahl JW, Gillece JD, Schupp JM, Waddell VG, Driebe EM, Engelthaler DM, *et al.* Evolution of a Pathogen: A Comparative Genomics Analysis Identifies a Genetic Pathway to Pathogenesis in *Acinetobacter*. PLoS One. 2013;8(1):e54287.
201. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(10):3471–84.
202. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268–81.
203. Chan PC, Huang LM, Lin HC, Chang LY, Chen ML, Lu CY, *et al.* Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007;28(4):423–9.
204. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). Clin Microbiol Infect. 2006;12(4):315–21.
205. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006–09). J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):2070–4.
206. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76(2):217–21.
207. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF, Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 2016;47(4):317–23.
208. European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Stockholm: ECDC; 2016.
209. Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos S, Maniatis AN, Sofianou D. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. J Antimicrob Chemother. 2003;52(6):1046–7.
210. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Spanakis N, Markogiannakis A. Carriage of OXA-58 but not of OXA-51 beta-lactamase gene correlates with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2006;58(5):1097–9.
211. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, *et al.* Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. J Antimicrob Chemother. 2006;57(3):557–61.
212. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440–58.
213. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 1993;2(2):81–7.
214. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: Report from the SENTRY Surveillance Program. J Antimicrob Chemother. 2009;63(1):55–9.
215. Castanheira M, Costello SE, Woosley LN, Deshpande LM, Davies TA, Jones RN. Evaluation of

- clonality and carbapenem resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex and *Enterobacteriaceae* isolates collected in European and Mediterranean countries and detection of two novel β -lactamases, GES-22 and VIM-35. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7358–66.
216. Labarca JA, Costa Salles MJ, Seas C, Guzman-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(2):276–92.
 217. Lowings M, Ehlers MM, Dreyer AW, Kock MM. High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa - an update. *BMC Infect Dis*. 2015;15:521.
 218. D'Arezzo S, Principe L, Capone A, Petrosillo N, Petrucca A, Visca P. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):54–61.
 219. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP. Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. *Biomed Res Int*. 2014;2014:305784.
 220. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(2):583–8.
 221. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):24–38.
 222. Brown S, Amyes S. OXA beta-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):1–3.
 223. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):35–40.
 224. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):233–8.
 225. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a Novel Class D beta -Lactamase with Carbapenemase Activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1556–61.
 226. Giordano A, Varesi P, Bertini A, Villa L, Dionisi AM, Venditti M, *et al*. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb Drug Resist*. 2007;13(1):37–43.
 227. Wang H, Guo P, Sun H, Wang H, Yang Q, Chen M, *et al*. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):4022–8.
 228. Lee K, Kim M-N, Choi TY, Cho S-E, Lee S, Whang DH, *et al*. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(6):520–4.
 229. Lu P, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):641–7.
 230. Goic-Barisic I, Towner KJ, Kovacic A, Sisko-Kraljevic K, Tonkic M, Novak A, *et al*. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J Hosp Infect*. 2011;77(4):368–9.
 231. Werneck JS, Picao RC, Carvalhaes CG, Cardoso JP, Gales AC. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(2):452–4.

232. Zarrilli R, Giannouli M, Rocco F, Loman NJ, Haines AS, Constantinidou C, *et al.* Genome Sequences of Three *Acinetobacter baumannii* Strains Assigned to the Multilocus Sequence Typing Genotypes ST2, ST25, and ST78. *J Bacteriol.* 2011;193(9):2359–60.
233. Da Silva GJ, Mendonça N, Batista G, Duarte A. Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected over 10 years. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2254–6.
234. Grosso F, Quinteira S, Peixe L. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(8):1275–9.
235. Acosta J, Merino M, Viedma E, Poza M, Sanz F, Otero JR, *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(6):1064–7.
236. Lu PL, Huang LY, Lian ST, Chang K, Lin CL, Hwang IJ, *et al.* How carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed hospital. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(5):463–6.
237. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):202–8.
238. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1613–7.
239. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(4):627–32.
240. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):197–201.
241. Zarrilli R, Vitale D, Di Popolo A, Bagattini M, Daoud Z, Khan AU, *et al.* A plasmid-borne *bla*_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):4115–20.
242. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1442–8.
243. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5035–8.
244. Gionco B, Pelayo JS, Venancio EJ, Cayo R, Gales AC, Carrara-Marroni FE. Detection of OXA-231, a new variant of *bla*_{OXA-143}, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: a case report. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(10):2531–2.
245. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2121–6.
246. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(2):756–8.
247. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;258(1):72–7.
248. Ikonomidis A, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S. Hidden VIM-1 metallo- β -

- lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2008;46(1):346–9.
249. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, *et al.* Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(5):1229–35.
 250. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, *et al.* IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3):710–4.
 251. Da Silva G, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa J, Leitão R, *et al.* Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol Lett. 2002;215(1):33–9.
 252. Domingues S, Nielsen KM, Da Silva GJ. The *bla*_{IMP-5}-carrying integron in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain is flanked by miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs). J Antimicrob Chemother. 2011 12;66(11):2667–8.
 253. Gales AC, Pfaller MA, Sader HS, Hollis RJ, Jones RN. Genotypic Characterization of Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter* spp. Isolated in Latin America. Microb Drug Resist. 2004;10(4):286–91.
 254. Yamamoto M, Nagao M, Matsumura Y, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, *et al.* Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *bla*_{IMP-19} among *Acinetobacter* species in Japan. J Antimicrob Chemother. 2011;66(11):2480–3.
 255. Sung JY, Kwon KC, Park JW, Kim YS, Kim JM, Shin KS, *et al.* Dissemination of IMP-1 and OXA Type β-Lactamase in Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Korean J Lab Med. 2008;28(1):16-23.
 256. Telang N, Satpute M, Dhakephalkar P, Niphadkar K, Joshi S. Fulminating septicemia due to persistent pan-resistant community-acquired metallo-β-lactamase (IMP-1)-positive *Acinetobacter baumannii*. Indian J Pathol Microbiol. 2011;54(1):180–2.
 257. Yum J, Yi K, Lee H, Yong D, Lee K, Kim J, *et al.* Molecular characterization of metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. J Antimicrob Chemother. 2002;49(5):837–40.
 258. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ, *et al.* VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis. 2006;12(6):981–3.
 259. Lee M-F, Peng C-F, Hsu H-J, Chen Y-H. Molecular characterisation of the metallo-β-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. Int J Antimicrob Agent. 2008;32(6):475–80.
 260. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. First identification of VIM-4 metallo-β-lactamase in *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect. 2008;14(3):289–90.
 261. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier J, *et al.* Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(11):4485–91.
 262. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. J Antimicrob Chemother. 2010;65(10):2253–4.
 263. Bogaerts P, Rezende de Castro R, Roisin S, Deplano A, Huang TD, Hallin M, *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J Antimicrob Chemother. 2012;67(6):1552–3.

264. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, *et al.* Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(9):E362–5.
265. Nemec A, Krizova L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the NDM-1 gene, Czech Republic, 2011. Euro Surveill. 2012;17(11). pii: 20121.
266. Islam MA, Talukdar PK, Hoque A, Huq M, Nabi A, Ahmed D, *et al.* Emergence of multidrug-resistant NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Bangladesh. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(10):2593–600.
267. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother. 2011;66(6):1255–9.
268. Voulgari E, Politi L, Pitiriga V, Dendrinis J, Poulou A, Georgiadis G, *et al.* First report of an NDM-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. Int J Antimicrob Agents. 2016;48(6):761–2.
269. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. J Antimicrob Chemother. 2011;66(6):1260–2.
270. Ghazawi A, Sonnevend Á, Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P, Hashmey R, *et al.* NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates. Clin Microbiol Infect. 2012;18(2):E34–6.
271. Espinal P, Fugazza G, Lopez Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, *et al.* Dissemination of an NDM-2-Producing *Acinetobacter baumannii* Clone in an Israeli Rehabilitation Center. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):5396–8.
272. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):1354–7.
273. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;55(1):349–54.
274. Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, *et al.* Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. J Proteome Res. 2006;5(12):3385–98.
275. Siroy A, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, *et al.* Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(12):4876–83.
276. Héritier C, Poirel L, Lambert T, He C, Nordmann P. Contribution of Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:3198–202.
277. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2009;47(12):4055–9.
278. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: Old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. Ann Pharmacother. 1999;33(9):960–7.
279. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? Pharmacotherapy. 2015;35(1):22–7.
280. Hejnar P, Kolár M, Hájek V. Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med. 1999;142:73–7.

281. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). Stockholm: ECDC; 2015.
282. Flamm RK, Castanheira M, Streit JM, Jones RN. Minocycline activity tested against *Acinetobacter baumannii* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia* species complex isolates from a global surveillance program (2013). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;2011–4.
283. Dobrewski R, Savov E, Bernards A, van den Barselaar M, Nordmann P, van den Broek P, *et al*. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(11):1135–7.
284. Ko KS, Suh JY, Kwon KT, Jung SI, Park KH, Kang CI, *et al*. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(5):1163–7.
285. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, *et al*. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3370–9.
286. Pelletier MR, Casella LG, Jones JW, Adams MD, Zurawski DV, Hazlett KR, *et al*. Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4831–40.
287. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, *et al*. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(12):4971–7.
288. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence *ISAbal1* is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):3022–4.
289. Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: A case report from France. *J Infect Dis*. 2011;204(7):1146–7.
290. López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Peréz F, Smani Y, Fernández-Reyes M, *et al*. Impaired virulence and *in vivo* fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis*. 2011;203(4):545–8.
291. Qureshi Z, Hittle L, O'Hara J, Rivera J, Syed A, Shields R, *et al*. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis*. 2015;60(9):1295–303.
292. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, *et al*. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):2946–50.
293. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(1):351–2.
294. Tan CH, Li J, Nation RL. Activity of colistin against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3413–5.
295. Li J, Nation RL, Owen RJ, Wong S, Spelman D, Franklin C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin Infect Dis*. 2007;45(5):594–8.
296. Vidaillac C, Benichou L, Duval RE. *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4856–61.

297. López-Rojas R, McConnell MJ, Jiménez-Mejías ME, Domínguez-Herrera J, Fernández-Cuenca F, Pachón J. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: Effect on virulence and bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4587–9.
298. Hraiech S, Roch A, Lepidi H, Atieh T, Audoly G, Rolain JM, *et al.* Impaired virulence and fitness of a colistin-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in a rat model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):5120–1.
299. Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, *et al.* Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):518–26.
300. Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: A proteomic perspective. *Proteomics.* 2009;9(6):1632–45.
301. Pournaras S, Koumaki V, Gennimata V, Kouskouni E, Tsakris A. *In Vitro* Activity of Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii*: Global Epidemiology and Resistance Mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2016;897:1–14.
302. Hawkey P, Finch R. Tigecycline: *In-vitro* performance as a predictor of clinical efficacy. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(4):354–62.
303. Hoban DJ, Reinert RR, Bouchillon SK, Dowzicky MJ. Global *in vitro* activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004-2013. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015;14(1):27.
304. Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC Within a Global Collection of *Acinetobacter baumannii* Collected as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. *Clin Ther.* 2012;34(1):101–12.
305. Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(5):1001–4.
306. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):557–62.
307. Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4389–93.
308. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):947–53.
309. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz De Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, *et al.* Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5247–57.
310. Chen Q, Li X, Zhou H, Jiang Y, Chen Y, Hua X, *et al.* Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):72–6.
311. Reid GE, Grim S a, Aldeza C a, Janda WM, Clark NM. Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy.* 2007;27(8):1198–201.
312. Héritier C, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(1):115–8.
313. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, *et al.* PCR detection of

- metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}* in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol*. 1996;34(12):2909–13.
314. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(6):321–31.
 315. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015.
 316. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline, 3rd ed. CLSI document M23-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2008.
 317. International Organization for Standardization. ISO 20776-2: 2007(E). Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 2: evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland; 2007.
 318. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th Informational Supplement. CLSI Document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2010.
 319. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(4):821–3.
 320. Gillespie SH (ed). Antibiotic resistance: methods and protocols. Humana Press, Totowa, NJ; 2001.
 321. Vanhommerig E, Moons P, Pirici D, Lammens C, Hernalsteens JP, De Greve H, *et al*. Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104561.
 322. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al*. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–77.
 323. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for Colistin (Polymyxin E) MIC Testing - Joint EUCAST and CLSI Recommendation (22 March, 2016). 2016. Available from: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/guidance_documents/.
 324. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, *et al*. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:351–3.
 325. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(3):305.
 326. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119–23.
 327. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is *IS_{ABA-1}* customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243(2):425–9.
 328. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812–4.
 329. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, *et al*. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3628–34.

330. Hood MI, Becker KW, Roux CM, Dunman PM, Skaar EP. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2013;81(2):542–51.
331. Burmølle M, Bahl MI, Jensen LB, Sørensen SJ, Hansen LH. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. *Microbiology*. 2008;154(1):187–95.
332. Pederick VG, Eijkelkamp BA, Ween MP, Begg SL, Paton JC, McDevitt CA. Acquisition and role of molybdate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(21):6843–52.
333. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, *et al*. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9636–41.
334. Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, *et al*. Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e72968.
335. Xavier BB, Sabirova J, Pieter M, Hernalsteens J-P, de Greve H, Goossens H, *et al*. Employing whole genome mapping for optimal de novo assembly of bacterial genomes. *BMC Res Notes*. 2014;7:484.
336. Karaïskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(10):1351–70.
337. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Consumption of antimicrobials of Polymyxins (ATC group J01XB) in the hospital sector in Europe. Stockholm: ECDC; [Accessed 10 Jan 2017]. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/Antimicrobial-consumption-rates-by-country.aspx.
338. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):443–8.
339. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures - antimicrobial susceptibility testing of colistin - problems detected with several commercially available products. 2016. Available from: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/#c13111.
340. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres M, Fernández-Cuenca F, *et al*. Nosocomial Outbreak of Infection With Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(3):257–63.
341. Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(6):525–30.
342. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* Infections. *Clin Infect Dis*. 2010;51(1):79–84.
343. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Körber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(8):737–42.
344. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat*. 2012;15(4):237–47.
345. Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*. 2014;74(12):1315–33.

346. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, *et al.* Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4625–30.
347. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, *et al.* Reply to “Reliability of gradient diffusion methods for detection of acquired colistin resistance.” *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(7):4424–5.
348. Pournaras S, Poulou A, Dafopoulou K, Chabane YN, Kristo I, Makris D, *et al.* Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):828–32.
349. Dafopoulou K, Xavier BB, Hotterbeekx A, Janssens L, Lammens C, Goossens H, *et al.* Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains with deficient biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1892–5.
350. Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, *et al.* Predominance of international clone 2 OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: Results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;in press.